

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

**FACULTAD DE VETERINARIA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA Y CIRUGÍA ANIMAL**



**Estudio histológico e inmunohistoquímico
diferencial de inmunofenotipo, angiogénesis y
patrón de metástasis en el cáncer inflamatorio
mamario canino con respecto a otros tumores
mamarios malignos**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Mónica Clemente Lara

Bajo la dirección de las doctoras:

Dña. Laura Peña Fernández y M^a Dolores Pérez Alenza

Madrid, 2010

ISBN: 978-84-693-2379-3



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE VETERINARIA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA Y CIRUGÍA ANIMAL

*Estudio histológico e inmunohistoquímico diferencial de
inmunofenotipo, angiogénesis y patrón de metástasis en el cáncer
inflamatorio mamario canino con respecto a otros tumores mamarios
malignos*

Memoria que presenta Dña. Mónica Clemente Lara para la obtención del grado de Doctor.

Directoras: Laura Peña Fernández
M^a Dolores Pérez Alenza

Madrid, 2009

*A mis padres, los auténticos partícipes de todo lo que soy
y lo que espero llegar a ser.*

AGRADECIMIENTOS

Parece mentira pero ya han pasado cuatro años desde que comencé a trabajar en el proyecto que finalmente ha dado lugar a esta Tesis Doctoral. Durante todo este tiempo muchas personas han aportado su granito de arena a este trabajo que aquí termina y que cierra un ciclo importante de mi vida. Me gustaría aprovechar este momento para agradecer a todas las personas que, de una forma u otra y desde dentro o fuera de la Universidad, me han ayudado en este largo camino recorrido para obtener el título de Doctora. Si no fuera por todos y cada uno de vosotros no habría sido posible obtener este resultado. Aunque resulta difícil recoger en unas pocas líneas el enorme apoyo que he tenido por parte de mucha gente, lo voy a intentar.

En primer lugar quiero agradecer a mis directoras de Tesis, Laura Peña Fernández y M^a Dolores Pérez Alenza. Gracias por haberme dado la oportunidad de formar parte de vuestro equipo, por el tiempo y esfuerzo dedicado, por todo lo que me habéis enseñado y por mostrarme el “mundo de la investigación”. Laura, a diferencia de las células que hemos descubierto, este ciclo sí que tiene fin, pero se cierra con muchos recuerdos y anécdotas. Lola, gracias por ser mi “mami profesional” y mi amiga desde aquel día de hace cuatro años en que me senté en tu despacho frente a ti y cuando me dijiste que necesitabais un becario te dije: “yo soy la becaria que buscáis”.

En segundo lugar quiero agradecer a mis padres y a mi hermano, gracias por darlo todo por mí a lo largo de mi vida, por ayudarme en todo lo que he necesitado, por apoyarme y animarme siempre y por haberme enseñado que hay que mantener la calma y tener paciencia en la vida, porque tarde o temprano todo llega si se trabaja con esfuerzo. A Fede, que no sólo ha participado activamente en esta Tesis Doctoral en todo lo que ha estado en su mano, sino que además ha tenido una tarea más importante y difícil de lograr animándome a seguir, sacándome una sonrisa cada día, quitándome los agobios y dándome un aliciente más por el que finalizar este trabajo. También quiero darle las gracias al resto de mi familia que se han molestado por conocer y entender mi trabajo y que han estado pendientes de mí en todo momento.

A Sara, no puedo agradecerte todo lo que has hecho por mí porque llenaría hojas, pero en resumen, siempre has estado cuando te he necesitado, ¡incluso haciendo inmunes! A Jimena, quien me hubiera dicho hace 5 años que serías la mejor compañera de Tesis que podría haber tenido, gracias por millones de momentos como amiga y compañera. A Ana Vicente, que además de participar en este trabajo como amiga, ha realizado un procesado cuidado y detallado de las muestras de microscopía electrónica para que pudiéramos conseguir unas fotos super chulas. A M^a Ángeles, que aunque ahora está lejos físicamente, siempre se siente que está cerca y que además de enseñarme a hacer inmunes con ella aprendí muchas más cosas.

Al técnico de laboratorio Pedro Aranda, gracias por dedicar tanto tiempo y cuidado en el manejo de mis muestras, por no cansarte de mis incesantes peticiones de cortes de última hora y por sacarme de más de un apuro. A los técnicos de laboratorio Mario Hernando y Fernando y a todos los becarios y ayudantes que han pasado por el laboratorio de Histología.

A los profesores del Departamento de Medicina y Cirugía, especialmente a Alfredo y Ángel por acogerme en su despacho como una más. A Belén que me ha ayudado con muchas cuestiones de muy diferentes tipos. A Rosa, que sin ella más de una de mis inmunes hubiera sido un desastre. A las secretarías de nuestro departamento: Laura y M^a José, por ayudarme con todos los papeleos. Y del Departamento de Fisiología, al profesor Juan Carlos Illera por su colaboración en el proyecto, en general, y en mi trabajo en particular.

A Francesco Sassi, de la Universidad de Bolonia (Italia), por ayudarme a “contar vasos”.

A Pedro Cuesta, del Centro de Cálculo de la UCM, por su disposición y orientación en el estudio estadístico. Gracias por hacerme entender ese desconocido mundo de la estadística.

A Guillermo Couto, por darme una visión diferente de la Oncología (no mamaria) y hacerme pensar en el nuevo ciclo que podría comenzar.

Al resto de becarias-sufridoras-compañeras como Tania, lo que hemos padecido juntas y lo bien que nos han venido nuestras charlas-terapia, a Alejandra, Mari Paz, Carolina. Gracias por estar ahí.

Y no podría terminar sin agradecer a mis amigos de siempre, mi grupo, mi gente. Sé que muchos nunca habéis entendido lo que hacía, como Yébenes, Boveda, Gory o Villegas, otros os habéis reído de mí por muchas cosas como por “contar células”, como Pit, Parra, Rubén y Vita, otras como Bea, Sara, Fanny, Irene y Sara pensabais que nunca más me volveríais a ver por mis encierros de trabajo... A todos vosotros os quiero agradecer de verdad que hayáis pasado esto conmigo, habéis tenido mucho que ver en que haya llegado hasta aquí. Además, no me he olvidado, gracias Alfon por la maravillosa portada, ha sido un honor para mí. Y Vane, también gracias.

Este trabajo se ha realizado dentro del Proyecto de Investigación del Ministerio de Educación y Ciencia (Área de Biomedicina) SAF2005-03559.

RESUMEN

El carcinoma inflamatorio (CI) mamario es el tumor de mama más agresivo y de peor pronóstico, tanto en la mujer como en la especie canina y se caracteriza por presentar un curso clínico fulminante. Se considera un tipo especial de cáncer mamario y se desconocen la mayoría de sus características, aunque la investigación en los últimos años ha empezado a dar sus frutos. El estudio del CI mamario en la mujer es complicado, el tratamiento de elección para este tipo de cáncer no es quirúrgico, sino que se recomienda quimioterapia y radioterapia previamente a la cirugía; por tanto, es difícil obtener muestras tumorales no tratadas. Sin embargo, en la especie canina, en la mayoría de las ocasiones las perras con CI se presentan en un estado avanzado de la enfermedad y no se suele establecer tratamiento médico con quimioterapia, siendo la eutanasia la opción más recomendable, lo que permite la toma de muestras tumorales no tratadas y de órganos afectados por el CI. Por otro lado, se ha demostrado que la perra es un buen modelo animal para el estudio del CI mamario de la mujer, ya que tienen características epidemiológicas, clínicas e histológicas similares. En esta Tesis Doctoral nos hemos propuesto estudiar aspectos desconocidos de esta neoplasia tan agresiva. Los objetivos del presente trabajo fueron, caracterizar el inmunofenotipo y la angiogénesis del CI mamario canino con respecto a otros tumores mamarios caninos malignos “no inflamatorios” metastásicos de elevada malignidad histológica (TMM no-CI) y determinar el patrón de metástasis de los tumores CI en comparación con los TMM no-CI.

Para el estudio de inmunofenotipo y angiogénesis se han analizado mediante histopatología e inmunohistoquímica 42 muestras de tumores mamarios malignos metastásicos: 22 CI y 20 TMM no-CI; se incluyeron 4 muestras de mama normal (MN) procedentes de 4 perras sanas. Todos los animales fueron evaluados clínicamente en la consulta de Oncología Mamaria y patológicamente en el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Clínico Veterinario (HCV) de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid (UCM) entre los años 1995-2008. En todos los casos, se llevó a cabo el tratamiento quirúrgico o paliativo de las neoplasias y se realizó un seguimiento clínico hasta el momento de la eutanasia del animal. El estudio inmunohistoquímico se ha llevado a cabo en muestras de biopsia o necropsia en los TMM no-CI y en muestras de necropsia en los CI. El estudio de inmunofenotipo y de angiogénesis se realizó empleando los siguientes marcadores: marcadores de estirpe celular (citoqueratina de amplio espectro (pancitoqueratina), citoqueratina 14, vimentina, α -actina de músculo liso y desmina), marcadores de receptores de hormonas esteroideas (RE α , RE β , RP, RA), marcadores de células endoteliales (Factor von Willebrand, CD31, CD34), factores de angiogénesis (VEGF-A, VEGF-D, VEGFR-3, COX2) y marcadores de proliferación tumoral (Ki-67). Asimismo, se evaluó la presencia de estructuras tipo comedo, de células tumorales altamente malignas semejantes a endoteliales (mimetismo vascular), de miofibroblastos y de células mioepiteliales en los tumores CI y TMM no-CI. Por último, en todos los tumores se estudió la densidad microvascular y el índice de proliferación de los vasos linfáticos.

Por otro lado, para el estudio del patrón de metástasis, se han incluido 72 perras con tumores mamarios metastásicos evaluadas en la consulta de Oncología Mamaria y necropsiadas en el Servicio de Anatomía Patológica del HCV de la UCM entre los años 1995-2008. De las 72 perras, 39 fueron diagnosticadas de CI y 33 de TMM no-CI (incluyendo las 42 perras del estudio de inmunofenotipo y angiogénesis). Durante la necropsia se anotaron los hallazgos macroscópicos y se tomaron las muestras correspondientes, para su posterior estudio histopatológico.

Los resultados del estudio de inmunofenotipo y angiogénesis revelaron que la mayoría de los CI son de origen epitelial, a excepción de un caso de origen mesenquimatoso. Como consecuencia de esto, el nombre de carcinoma inflamatorio mamario canino debe ser reemplazado por el término de **cáncer mamario inflamatorio canino**, al igual que en medicina humana.

Se observó que las células del cáncer mamario inflamatorio (CMI) canino co-expresan citoqueratina y vimentina con mayor frecuencia (71,4%) que las células tumorales de los TMM no-CMI (37,5%), indicando una mayor indiferenciación y agresividad tumoral por parte de los CMI.

La presencia de miofibroblastos fue observada con mayor frecuencia en el CMI que en los TMM no-CMI, hecho que podría relacionarse con los mecanismos especiales de infiltración e invasión tumoral que aparecen en los CMI.

No existieron diferencias significativas entre los CMI y los TMM no-CMI en cuanto a la inmunexpresión de los receptores de hormonas esteroideas RE α , RP y RA, pero sí con respecto a la inmunexpresión del RE β , que fue significativamente mayor en el CMI que en los TMM no-CMI. Algunos receptores hormonales (RE β , RP y RA) se asociaron con diversos factores de angiogénesis, indicando que las hormonas esteroideas podrían actuar en el proceso de angiogénesis y linfangiogénesis, especialmente en el CMI.

El CMI presentó una expresión significativamente mayor de los factores de angiogénesis VEGF-A, VEGF-D y COX-2 y contenía una mayor densidad de microvascularización y un mayor índice de proliferación de vasos linfáticos que los TMM no-CMI.

La expresión de COX-2 en el CMI se asoció con el factor VEGF-D, mientras que en los casos de TMM no-CMI se encuentra asociada con el factor VEGF-A. De acuerdo con esto, es posible que los mecanismos de angiogénesis y linfangiogénesis sean diferentes en ambos grupos de tumores.

Por primera vez en la especie canina y en un proceso neoplásico de aparición espontánea en la especie animal se ha demostrado la presencia de células tumorales altamente agresivas formadoras de canales vasculares semejantes morfológicamente a capilares, denominadas *endothelial-like cells* (ELCs), implicadas en el fenómeno de mimetismo vascular. Este fenómeno se observó más frecuentemente en los CMI que en los TMM no-CMI, pero no es un fenómeno exclusivo de los CMI.

La diferente inmunoexpresión de VEGF-A, VEGF-D y COX-2 junto con la presencia del mimetismo vascular sugieren que dichos factores, especialmente COX-2, podrían participar en la formación del mimetismo vascular.

Los resultados del estudio de patrón de metástasis en necropsia mostraron que existe una distribución de metástasis a distancia diferente entre los CMI mamarios y los TMM no-CMI. Sólo existieron metástasis en la vejiga de la orina y en el aparato reproductor en casos de CMI. Por otro lado, las metástasis de los CMI fueron menos frecuentes en el pulmón, hígado y riñón que para los TMM no-CMI y en ningún caso se localizaron en el hueso.

SUMMARY

Inflammatory mammary carcinoma (IC) is considered the most aggressive type of mammary tumor and the one with the worst prognosis for survival in both dogs and humans. This type of tumor is considered a special type of mammary cancer and it is characterized by having a fulminant clinical course. Most of its characteristics are still unknown but new research has started providing us with answers. The research of IC in humans is very complicated since a combination of chemotherapy and radiation therapy are recommended before surgical excision of the tumor, thus making it very difficult to obtain good tissue samples for analysis of untreated tumor cells. On the other hand, canine cases tend to show up at veterinary clinics in a more advanced state of disease, where chemotherapy is not an option anymore, thus making elective euthanasia the most recommended route of action. This makes it easier to obtain samples from untreated tumor and other affected organs. It has been shown that the canine species is a good model for researching IC in women since there are very similar epidemiologic, clinical and histological features between the two species. We have decided to study various unknown aspects of this very aggressive type of tumor in this Doctoral Thesis. The objectives for this research project were to characterize the immunophenotype and the angiogenic features of mammary IC with respect to malignant mammary tumors with high histological malignancy (MMT non-IC) and determine the metastatic pattern of IC tumors in comparison to (MMT non-IC).

For the immunophenotype and angiogenesis part of the project, we have performed histopathology and immunohistochemistry on 42 tumor samples from 42 bitches diagnosed with metastatic malignant mammary tumors. Out of the 42 samples, 22 were considered IC and 20 were considered malignant (MMT non-IC). In addition, 4 mammary samples from healthy dogs were included for comparison. All the animals in this study were clinically evaluated in the Mammary Oncology Department and pathologically in the Pathologic Anatomy Service of the Veterinary Clinical Hospital (VCH) at the Complutense University of Madrid (CUM) from 1995-2008. In every case, surgical or palliative treatment was performed and the animals were followed and assessed until the time of euthanasia. The immunohistochemistry study was performed from biopsy or necropsy samples for MMT non-IC and from necropsy samples for IC. The immunophenotype and angiogenesis study was performed with the use of several markers. Cellular markers (wide spectrum cytokeratin (pancytokeratin), cytokeratin 14, vimentin, smooth muscle α -actin and desmin), steroid hormone receptor markers (ER α , ER β , PR, AR), endothelial cell markers (von Willebrand Factor, CD31, CD34), growth factors related to angiogenesis (VEGF-A, VEGF-D, VEGFR-3, COX2) and tumor proliferation markers (Ki-67). Other features were also evaluated, including the presence of comedo type structures, presence of endothelial like-tumor cells of vasculogenic mimicry phenomenon, myofibroblast and myoepithelial cells in IC and MMT non-IC. The microvascular density and proliferation index of lymphatic vessels was also studied in every tumor sample.

On the other hand, for the metastasis pattern study we have included 72 dogs with metastatic mammary tumors evaluated at the Mammary Oncology Service and the Anatomic Pathology Service of the VCH at the CUM from 1995-2008. Of those 72 dogs, 39 of them were diagnosed with IC and 33 with MMT non-IC. For this part of the project, we included the original 42 dogs from the immunophenotype and angiogenesis study. During necropsy, macroscopic findings were detailed and samples were taken from all organs suspect of metastatic involvement for histopathological evaluation.

The results for the immunophenotype and angiogenesis study revealed that most of the IC are from epithelial origin, with only one case being of mesenchymal origin. Based on these findings, the name inflammatory mammary carcinoma should be replaced by the term *canine inflammatory mammary cancer*, the same way it is done in human medicine.

We learned that cells from canine inflammatory mammary cancer (IMC) express cytokeratin and vimentin with a higher frequency (71.4%) than tumor cells from MMT non-ICM (37.5%), thus showing a greater undifferentiation and tumor aggressiveness from IMC.

Myofibroblasts were abundantly found in IMC when compared to MMT non-IMC possibly having to do with the great capacity of invasion and infiltration of IMC tumors.

There were no significant differences between IMC and MMT-non IMC with the expression of steroid hormone receptors ER α , PR and AR, but a significant difference was found with the immunoexpression of ER β . This was higher in IMC when compared to MMT non-IMC. Some steroid hormone receptors (ER β , PR and AR) were associated with various angiogenesis factors, indicating that steroid hormones could be involved in the angiogenesis and lymphangiogenesis process, especially in IMC.

The tumor cells from IMC expressed higher proportions of the angiogenesis factors VEGF-A, VEGF-D and COX-2 and had a higher microvascular density and lymphatic vessel proliferation than the MMT non-IMC cells.

The expression of COX-2 in IMC was associated with the factor VEGF-D, while in MMT non-IMC cases, the expression of COX-2 is correlated to that of VEGF-A. With these results, it is possible that the angiogenesis and lymphangiogenesis mechanisms are different in each group of tumors.

For the first time ever in the canine species, and first time in a spontaneous appearing neoplastic process in all animal species, we demonstrated the presence of vascular channel forming, highly aggressive tumor cells morphologically similar to capillaries, named endothelial-like tumor cells (ELCs), which relate to the phenomenon of vasculogenic mimicry. Vasculogenic mimicry was observed in both IMC and MMT non-IMC but was more frequent in IMC.

The different immunoexpression of VEGF-A, VEGF-D and COX-2, together with the presence of vasculogenic mimicry, suggest that said factors, especially COX-2, could participate in the formation of the vasculogenic mimicry phenomenon.

The results of the study of the metastatic pattern in necropsy showed differences in the metastatic patterns between IMC tumors and MMT non-IMC. Metastasis to the urinary bladder and the reproductive tract were only observed in IMC cases. On the other hand, metastasis from IMC was less frequent to the lungs, liver and kidneys than in MMT non-IMC and it was never found to be localized in the bones.

ÍNDICE

Estudio histológico e inmunohistoquímico diferencial de inmunofenotipo, angiogénesis y patrón de metástasis en el cáncer inflamatorio mamario canino con respecto a otros tumores mamaros malignos.

| | |
|--|----------|
| I. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS | 1 |
| II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA | 5 |
| 1. CARCINOMA INFLAMATORIO MAMARIO EN LA ESPECIE CANINA Y HUMANA----- | 5 |
| 1.1. Introducción----- | 5 |
| 1.2. Epidemiología del carcinoma inflamatorio mamario----- | 6 |
| 1.2.1. Carcinoma inflamatorio humano----- | 6 |
| 1.2.2. Carcinoma inflamatorio canino ----- | 9 |
| 1.3. Etiopatogenia del carcinoma inflamatorio mamario----- | 10 |
| 1.3.1. Carcinoma inflamatorio humano ----- | 11 |
| 1.3.2. Carcinoma inflamatorio canino ----- | 11 |
| 1.4. Clasificación del carcinoma inflamatorio mamario----- | 12 |
| 1.5. Características clínicas del carcinoma inflamatorio mamario----- | 14 |
| 1.5.1. Carcinoma inflamatorio humano----- | 14 |
| 1.5.2. Carcinoma inflamatorio canino----- | 17 |
| 1.6. Características histopatológicas del carcinoma inflamatorio mamario----- | 18 |
| 1.6.1. Carcinoma inflamatorio humano----- | 18 |
| 1.6.2. Carcinoma inflamatorio canino----- | 20 |
| 1.7. Diagnóstico del carcinoma inflamatorio mamario----- | 22 |
| 1.7.1. Carcinoma inflamatorio humano----- | 22 |
| 1.7.2. Carcinoma inflamatorio canino----- | 24 |
| 1.8. Factores pronóstico del carcinoma inflamatorio en la mujer y en la perra----- | 25 |
| 1.8.1. Edad----- | 26 |
| 1.8.2. Índice de masa corporal----- | 26 |
| 1.8.3. Diagnóstico clínico y/o patológico----- | 26 |
| 1.8.4. Extensión del eritema----- | 27 |
| 1.8.5. Tamaño del tumor----- | 27 |
| 1.8.6. Afectación ganglionar----- | 27 |
| 1.8.7. Metástasis a distancia----- | 28 |
| 1.8.8. Receptores hormonales----- | 28 |
| 1.8.9. Gen supresor tumoral p53----- | 30 |
| 1.8.10. Respuesta al tratamiento----- | 30 |

| | |
|--|-----------|
| 1.8.11. Genes con valor pronóstico----- | 31 |
| 1.9. Tratamiento del carcinoma inflamatorio----- | 31 |
| 1.9.1. Carcinoma inflamatorio humano----- | 31 |
| 1.9.2. Carcinoma inflamatorio canino----- | 35 |
| 1.10. Hallazgos de autopsia y necropsia del cáncer mamario de la mujer y la perra----- | 35 |
| 2. MODELOS EXPERIMENTALES DE CÁNCER INFLAMATORIO----- | 37 |
| 2.1. <i>In vitro</i> ----- | 37 |
| 2.2. <i>In vivo</i> ----- | 38 |
| 3. VASCULARIZACIÓN EN EL CARCINOMA INFLAMATORIO MAMARIO----- | 40 |
| 3.1. Angiogénesis tumoral----- | 40 |
| 3.1.1. Angiogénesis a partir de vasos preexistentes----- | 41 |
| 3.1.2. Angiogénesis a partir de células precursoras de células endoteliales----- | 43 |
| 3.1.3. Angiogénesis por co-opción vascular----- | 44 |
| 3.1.4. Mimetismo vascular----- | 45 |
| 3.2. Linfangiogenesis tumoral----- | 54 |
| 3.3. Factores de crecimiento del endotelio vascular y sus receptores----- | 55 |
| 3.3.1. Factor de crecimiento del endotelio vascular- A (VEGF-A)----- | 55 |
| 3.3.2. Factor de crecimiento del endotelio vascular-B (VEGF-B)----- | 57 |
| 3.3.3. Factor de crecimiento del endotelio vascular-C (VEGF-C)----- | 58 |
| 3.3.4. Factor de crecimiento del endotelio vascular-D (VEGF-D)----- | 61 |
| 3.3.5. Receptor del factor de crecimiento del endotelio vascular-1 (VEGFR-1)----- | 64 |
| 3.3.6. Receptor del factor de crecimiento del endotelio vascular-2 (VEGFR-2)----- | 64 |
| 3.3.7. Receptor del factor de crecimiento del endotelio vascular-3 (VEGFR-3)----- | 65 |
| 3.4. Otros factores relacionados con la angiogénesis tumoral----- | 67 |
| 3.4.1. Enzima ciclooxigenasa-2 (COX-2)----- | 67 |
| 3.4.2. Hormonas esteroides----- | 71 |
| 3.4.2.1. Regulación por estrógenos de VEGF y VEGFR en los tumores mamarios ----- | 71 |
| 3.4.2.2. Regulación por progesterona de VEGF y VEGFR en los tumores mamarios ----- | 72 |
| 3.4.2.3. Regulación por andrógenos de VEGF y VEGFR en los tumores mamarios ----- | 72 |
| 3.5. Utilización de marcadores inmunohistoquímicos de células endoteliales----- | 73 |
| 3.5.1. Factor von Willebrand----- | 73 |
| 3.5.2. CD31----- | 74 |
| 3.5.3. CD34----- | 75 |
| 3.5.4. Molécula D2-40----- | 75 |
| 3.6. Densidad microvascular tumoral----- | 76 |
| 3.6.1. Densidad microvascular conjunta----- | 76 |
| 3.6.2. Densidad vascular linfática----- | 78 |

III. MATERIAL Y MÉTODOS

81

| | |
|---|-----------|
| 1. ESTUDIO DE INMUNOFENOTIPO Y ANGIOGÉNESIS | 81 |
| 1.1. Animales | 81 |
| 1.2. Muestras | 85 |
| 1.2.1. Carcinoma inflamatorio mamario canino | 85 |
| 1.2.2. Tumores mamarios caninos malignos no CI | 85 |
| 1.2.3. Mama normal | 85 |
| 1.3. Estudio histopatológico | 86 |
| 1.3.1. Procesado de muestras para histopatología | 86 |
| 1.3.2. Diagnóstico histopatológico de los tumores mamarios | 86 |
| 1.3.3. Presencia de estructuras tipo comedo | 87 |
| 1.3.4. Evaluación del grado histológico de malignidad | 87 |
| 1.3.5. Células tumorales semejantes a endoteliales | 88 |
| 1.4. Estudio inmuohistoquímico | 89 |
| 1.4.1. Caracterización inmunohistoquímica de tipos celulares | 90 |
| 1.4.1.1. Detección inmunohistoquímica de citoqueratina (pancitoqueratina) | 90 |
| 1.4.1.2. Detección inmunohistoquímica de citoqueratina 14 | 92 |
| 1.4.1.3. Detección inmunohistoquímica de vimentina | 92 |
| 1.4.1.4. Detección inmunohistoquímica de actina de músculo liso | 93 |
| 1.4.1.5. Detección inmunohistoquímica de desmina | 93 |
| 1.4.1.6. Valoración de la inmunotinción de citoqueratinas (-pancitoqueratina y -14), vimentina, actina de músculo liso y desmina | 94 |
| 1.4.2. Estudio inmunohistoquímico de receptores hormonales | 95 |
| 1.4.2.1. Detección inmunohistoquímica del RE α | 95 |
| 1.4.2.2. Detección inmunohistoquímica del RE β | 97 |
| 1.4.2.3. Detección inmunohistoquímica del RP | 98 |
| 1.4.2.4. Detección inmunohistoquímica del RA | 99 |
| 1.4.2.5. Valoración de la inmunotinción de RE α , RE β , RP y RA | 100 |
| 1.4.3. Estudio inmunohistoquímico de células endoteliales | 100 |
| 1.4.3.1. Detección inmuohistoquímica del Factor Von Willebrand | 100 |
| 1.4.3.2. Detección inmuohistoquímica de CD31 | 102 |
| 1.4.3.3. Detección inmuohistoquímica de CD34 | 104 |
| 1.4.3.4. Detección inmuohistoquímica de la molécula D2-40 | 105 |
| 1.4.3.5. Valoración de la inmunotinción del Factor von Willebrand, CD31, CD34 y de la molécula D2-40 | 106 |
| 1.4.4. Estudio inmunohistoquímico de VEGF-A, VEGF-D y VEGFR-3 | 107 |
| 1.4.4.1. Detección inmuohistoquímica de VEGF-A | 107 |
| 1.4.4.2. Detección inmuohistoquímica de VEGF-D | 109 |
| 1.4.4.3. Detección inmuohistoquímica de VEGFR-3 | 109 |

| | |
|--|------------|
| 1.4.4.4. Valoración de la inmunotinción de VEGF-A, VEGF-D y VEGFR-3----- | 111 |
| 1.4.5. Estudio inmunohistoquímico de COX-2----- | 111 |
| 1.4.5.1. Valoración de la inmunotinción de COX-2----- | 111 |
| 1.4.6. Estudio inmunohistoquímico de proliferación tumoral (índice de Ki-67)----- | 112 |
| 1.4.6.1. Valoración de la inmunotinción. Índice de proliferación celular----- | 113 |
| 1.5. Estudio de densidad y proliferación vascular----- | 114 |
| 1.5.1. Estudio de densidad microvascular (DMV)----- | 114 |
| 1.5.2. Estudio de proliferación de vasos linfáticos (LV Ki-67 index)----- | 114 |
| 1.6. Estudio de microscopía electrónica de transmisión----- | 115 |
| 1.6.1. Muestras para microscopía electrónica----- | 115 |
| 1.6.2. Procesado de muestras para microscopía electrónica----- | 115 |
| 2. ESTUDIO DE PATRÓN DE METÁSTASIS----- | 116 |
| 2.1. Animales----- | 116 |
| 2.2. Muestras de tumores mamarios y metástasis----- | 117 |
| 2.3. Estudio histopatológico----- | 117 |
| 2.3.1. Procesado de muestras para histopatología----- | 117 |
| 2.3.2. Diagnóstico histopatológico----- | 117 |
| 3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO----- | 118 |
| 3.1. Análisis estadístico del estudio de inmunofenotipo y angiogénesis----- | 119 |
| 3.1.1. Base de datos----- | 119 |
| 3.1.2. Variables estadísticas----- | 119 |
| 3.1.2.1. Variables clínicas, epidemiológicas e histológicas----- | 119 |
| 3.1.2.2. Variables de receptores de hormonales RE α , RE β , RP y RA----- | 120 |
| 3.1.2.3. Variables de parámetros de angiogénesis----- | 120 |
| 3.1.2.3.1. Variables de los marcadores de células endoteliales----- | 120 |
| 3.1.2.3.2. Variables de los marcadores VEGF-A, VEGF-D y VEGFR-3----- | 121 |
| 3.1.2.3.3. Variables de COX-2----- | 122 |
| 3.1.2.3.4. Variables del índice Ki-67----- | 122 |
| 3.1.2.3.5. Variables de densidad microvascular (DMV)----- | 122 |
| 3.1.2.3.6. Variables de la proliferación de vasos linfáticos (LV Ki-67 index)----- | 123 |
| 3.2. Análisis estadístico del estudio de patrón de metástasis----- | 123 |
| 3.2.1. Base de datos----- | 123 |
| 3.2.2. Variables estadísticas----- | 123 |
| IV. RESULTADOS----- | 125 |
| 1. ESTUDIO DE INMUNOFENOTIPO Y DE ANGIOGÉNESIS EN EL CI MAMARIO CANINO-- | 125 |
| 1.1. Evaluación de los datos clínicos y epidemiológicos----- | 125 |
| 1.1.1. Edad----- | 125 |
| 1.1.2. Raza----- | 125 |

| | |
|--|-----|
| 1.1.3. Peso----- | 126 |
| 1.1.4. Estado reproductivo----- | 126 |
| 1.1.5. Estadio tumor-linfonodo-metástasis en la autopsia----- | 127 |
| 1.1.6. Tipo de carcinoma inflamatorio----- | 127 |
| 1.2. Estudio histopatológico----- | 128 |
| 1.2.1. Diagnóstico histopatológico de los tumores----- | 128 |
| 1.2.2. Presencia de estructuras tipo comedo----- | 133 |
| 1.2.3. Células tumorales semejantes a endoteliales (ELCs)----- | 135 |
| 1.3. Caracterización inmunohistoquímica de tipos celulares----- | 139 |
| 1.3.1. Valoración de la inmunotinción y clasificación del origen y tipo tumoral----- | 139 |
| 1.3.2. Estudio de detección de células mioepiteliales y miofibroblastos----- | 143 |
| 1.3.2.1. Cuantificación de células mioepiteliales y miofibroblastos----- | 144 |
| 1.3.2.2. Disposición de miofibroblastos----- | 145 |
| 1.4. Estudio inmunohistoquímico de receptores hormonales----- | 146 |
| 1.4.1. Estudio inmunohistoquímico del receptor RE α ----- | 146 |
| 1.4.2. Estudio inmunohistoquímico del RE β ----- | 148 |
| 1.4.3. Estudio inmunohistoquímico del RP----- | 150 |
| 1.4.4. Estudio inmunohistoquímico del RA----- | 152 |
| 1.5. Estudio inmunohistoquímico de marcadores de células endoteliales----- | 154 |
| 1.5.1. Estudio inmunohistoquímico del Factor von Willebrand----- | 154 |
| 1.5.2. Estudio inmunohistoquímico de CD31----- | 157 |
| 1.5.3. Estudio inmunohistoquímico de CD34----- | 159 |
| 1.5.4. Estudio inmunohistoquímico del marcador de células linfáticas D2-40----- | 161 |
| 1.6. Estudio inmunohistoquímico de VEGF-A, VEGF-D y VEGFR-3----- | 161 |
| 1.6.1. Estudio inmunohistoquímico del VEGF-A----- | 161 |
| 1.6.2. Estudio inmunohistoquímico del VEGF-D----- | 164 |
| 1.6.3. Estudio inmunohistoquímico del VEGFR-3----- | 166 |
| 1.7. Estudio inmunohistoquímico de COX-2----- | 168 |
| 1.8. Características inmuistoquímicas de las ELCs----- | 171 |
| 1.9. Estudio de proliferación tumoral. Índice de Ki-67----- | 172 |
| 1.10. Estudio de densidad y proliferación vascular----- | 172 |
| 1.10.1. Estudio de densidad microvascular (DMV)----- | 172 |
| 1.10.2. Estudio de proliferación de vasos linfáticos----- | 173 |
| 1.11. Estudio de microscopía electrónica de transmisión----- | 175 |
| 1.12. Análisis estadístico----- | 180 |
| 1.12.1. Asociaciones entre receptores hormonales, marcadores de angiogénesis, proliferación tumoral y vascular----- | 180 |
| 1.12.2. Asociaciones entre parámetros relacionados con la angiogénesis y de proliferación tumoral y vascular----- | 181 |
| 1.12.3. Análisis multivariante----- | 182 |

| | | |
|------|--|------------|
| 2. | ESTUDIO DE PATRÓN DE METÁSTASIS A DISTANCIA EN CI MAMARIO CANINO RESPECTO A TMM NO-CI ----- | 182 |
| 2.1. | Hallazgos de necropsia. Metastasis a distancia----- | 183 |
| V. | <u>DISCUSIÓN</u> | <u>191</u> |
| VI. | <u>CONCLUSIONES</u> | <u>229</u> |
| VII. | <u>BIBLIOGRAFÍA</u> | <u>231</u> |

LISTA DE ABREVIATURAS

- ADN-** Ácido desoxirribonucleico
- AJCC-** American Joint Committee in Cancer
- Ang-** Angiopoyetina
- ANOVA-** Análisis de la varianza
- ARN-** Ácido ribonucleico
- CEP-** Células precursoras de endoteliales
- CI-** Carcinoma inflamatorio
- COX-** Ciclooxygenasa
- DAB-** Diaminobencidina
- DMV-** Densidad microvascular
- DVL-** Densidad vascular linfática
- EGFR-** Receptor del factor de crecimiento epitelial
- ELCs-** Células tumorales formadoras de vasos (endothelial-like tumoral cells)
- ELISA-** Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas
- EVG-** Tinción van Gieson
- FGF-** Factor de crecimiento fibroblástico
- GHM-** Grado Histológico de Malignidad
- HCV-** Hospital Clínico Veterinario
- H-E-** Hematoxilina-Eosina
- IHQ-** Inmunohistoquímica
- ILV-** Invasión linfática de los vasos
- LABC-** Cáncer mamario localmente avanzado
- LIBC-** Cáncer mamario localmente invasivo
- LV Ki-67 index-** Índice de proliferación de los vasos linfáticos
- LYVE-1-** Receptor del endotelio vascular linfático
- MN-** Mama Normal
- MRI-** Imagen por resonancia magnética
- MV-** Mimetismo vascular
- NK-** Natural Killer
- OMS-** Organización Mundial de la Salud

PAS- Ácido peryódico de Schiff

PCR- Reacción en cadena de la polimerasa

PEV- Poussée évolutive

PLGF- Factor de crecimiento placentario

RA- Receptor de andrógenos

RE- Receptor de estrógenos alfa

RP- Receptor de progesterona

RT-PCR- Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real

ST- Supervivencia total

TBS- Tampón trifosfato salino

TGB- Factor de crecimiento transformante

TLE- Tiempo libre de enfermedad

TMC- Tumores mamarios caninos

TMM no-CI- Tumor mamario altamente maligno no carcinoma inflamatorio

TNF- Factor de necrosis tumoral

TNM- Tumor-Linfonodo-Metástasis

UCM- Universidad Complutense de Madrid

VEGF- Factor de crecimiento del endotelio vascular

VEGFR- Receptor del factor de crecimiento del endotelio vascular

VWF- Factor von Willebrand

I INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

I. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Los tumores mamarios son las neoplasias mas frecuentes en la perra (Brodey *et al.*, 1983; Moe, 2001). Dentro de los tumores mamarios caninos (TMC) malignos, el carcinoma inflamatorio (CI) es el más grave (Susaneck *et al.*, 1983; Perez Alenza *et al.*, 2001). A pesar de no ser un cáncer muy común, el CI es la neoplasia mamaria más agresiva y de peor pronóstico tanto en la especie canina (Susaneck *et al.*, 1983; Perez Alenza *et al.*, 2001), como en la mujer (Tavassoli, 1999; Mason y Johnson, 2008) y presenta un curso clínico fulminante y una supervivencia extremadamente baja, tanto la perra (Perez Alenza *et al.*, 2001) como en la mujer (Tavassoli, 1999; Giordano, 2003a).

Actualmente, tanto en la mujer (Jaiyesimi *et al.*, 1992; Tavassoli, 1999; Giordano, 2003a; Gong, 2008) como en la perra (Perez Alenza *et al.*, 2001), el CI se considera un tipo especial de tumor mamario maligno localmente avanzado con características genéticas, biológicas y clínicas diferentes con respecto al resto de los tumores mamarios malignos.

En la especie humana, se ha señalado que se trata de un tipo tumoral altamente angiogénico y angioinvasivo (Kleer *et al.*, 2000; Van der Auwera *et al.*, 2004). A pesar de su importancia, los estudios sobre la vascularización que se produce en este tipo de cáncer y los mecanismos de angiogénesis, son limitados en la especie humana e inexistentes en la especie canina. La investigación con tejidos procedentes de CI humano es difícil, ya que es el único tipo de neoplasia mamaria en el que está contraindicada la cirugía como primer tratamiento (Giordano y Hortobagyi, 2003b); en consecuencia, es complicado obtener muestras tisulares de pacientes no tratadas previamente con quimioterapia y/o radioterapia.

Se han realizado estudios *in vitro*, empleando líneas celulares que derivan de carcinomas inflamatorios humanos (Forozan *et al.*, 1999; van Golen *et al.*, 2000a) y estudios *in vivo* a través del desarrollo de modelos experimentales de CI humano en el ratón mediante el transplante de células tumorales de mujer a ratones (Alpaugh *et al.*, 1999; Shirakawa *et al.*, 2001). Por otro lado, las especies canina (Susaneck *et al.*, 1983) y felina (Perez Alenza *et al.*, 2004), son las únicas especies animales en las que se ha descrito la aparición espontánea de CI. Teniendo en cuenta las características histológicas

de los tumores mamarios felinos, éstos son un modelo más adecuado para el estudio de las neoplasias mamarias de la mujer que los TMC. Sin embargo, las características del CI felino indican que el CI mamario canino constituye el mejor modelo natural de estudio para el CI humano (Perez Alenza *et al.*, 2004).

Por la validez del CI mamario canino como modelo comparativo con el CI de la mujer y por su importancia en la especie canina, nuestro grupo de investigación está realizando diversos estudios, entre los que se encuadra el presente trabajo sobre diferentes aspectos de esta neoplasia tan agresiva.

Hasta el momento, no se han realizado investigaciones sobre los tipos celulares que participan en este tipo tumoral, ni sobre los mecanismos implicados en la angiogénesis o el patrón de metástasis a distancia del CI mamario canino. La falta de información sobre dichos aspectos del CI mamario canino, ha sido determinante para el desarrollo de la sistemática de este estudio. En muchos aspectos, hemos tenido que recurrir al cáncer inflamatorio mamario humano como referencia, siempre con la precaución de tener en cuenta que las enfermedades varían entre especies e incluso razas.

Los **objetivos** de este estudio se han elaborado en base a los hallazgos previos observados por este grupo de investigación y son los siguientes:

1. Caracterizar el inmunofenotipo del carcinoma inflamatorio mamario canino y de los tumores mamarios caninos malignos metastásicos de elevada malignidad histológica no inflamatorios (TMM no-CI), mediante un estudio histopatológico e inmunohistoquímico, con el fin de determinar y comparar entre ambos grupos de neoplasias los diferentes tipos celulares e histológicos.
2. Realizar un estudio inmunohistoquímico comparativo de carcinomas inflamatorios mamarios caninos y de TMM no-CI para determinar si existen diferencias entre ambos grupos con respecto a la proliferación celular (Ki-67), al perfil de receptores hormonales (RE α , RE β , RP y RA), a los factores relacionados con los mecanismos de angiogénesis tumoral (VEGF-A, VEGF-D, VEGFR-3 y COX-2) y la densidad y proliferación vascular.

3. Estudiar el fenómeno de mimetismo vascular mediante histopatología, inmunohistoquímica y microscopía electrónica en los CI y en los TMM no CI.
4. Comparar la localización de las metástasis a distancia en perras afectadas por carcinomas inflamatorios mamarios y en perras con tumores mamarios malignos metastásicos no inflamatorios, para determinar si el patrón de órganos afectados con metástasis a distancia es semejante o no en ambos grupos.

II REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1. CARCINOMA INFLAMATORIO MAMARIO EN LA ESPECIE CANINA Y HUMANA

1.1. Introducción

El Carcinoma Inflamatorio (CI) mamario es la neoplasia mamaria más agresiva y de peor pronóstico tanto en la mujer (Tavassoli, 1999) como en la perra (Pérez-Alenza *et al.*, 2001). Se trata de un tumor poco frecuente pero que presenta un curso clínico fulminante siendo la supervivencia de las mujeres y perras afectadas extremadamente baja (Tavassoli, 1999; Pérez-Alenza *et al.*, 2001; Giordano, 2003a; Peña *et al.*, 2003a; Peña *et al.*, 2003b).

El término carcinoma inflamatorio mamario es un término clínico que describe un tipo especial de tumor mamario localmente avanzado con diferentes características genéticas, biológicas y clínicas con respecto al resto de los tumores mamarios (Jaiyesimi *et al.*, 1992; Tavassoli, 1999; Pérez-Alenza *et al.*, 2001; Giordano, 2003a) y en la mujer se ha descrito que es un tipo tumoral altamente angiogénico y angioinvasivo (Kleer *et al.*, 2000). En la actualidad, la descripción de CI más usada procede del *American Joint Committee in Cancer* (AJCC), que le define como una entidad clínicopatológica caracterizada clínicamente por la presencia de un edema difuso y eritema de la mama, ocupando la mayor parte de la misma y frecuentemente sin presentar nódulo mamario (Greene *et al.*, 2002).

El carcinoma inflamatorio fue descrito por primera vez en la mujer en el año 1814 por Charles Bell en su libro *System of Operative Surgery*, quien lo caracterizó como un proceso doloroso, con la presencia de una coloración violácea de la piel sobre la zona del tumor. Desde ese momento el CI ha sido mencionado en la literatura bajo diferentes nombres como “el síndrome de von Volkmann’s”, “mastitis carcinomatosa”, “carcinoma mamario agudo”, “carcinoma escirro agudo”, “linfocitoma de mama”, “cáncer encefaloide agudo”, “cáncer agudo de la mama”, “carcinomatosis mamaria aguda”, y “cáncer de lactación” (Klotz, 1869; Von Volkmann y Brust, 1875; Leitch, 1909; Schumann, 1911; Learmont, 1916; Rasch, 1931). En definitiva, todas estas expresiones indican la existencia de un cáncer mamario agudo y agresivo (Anderson *et al.*, 2005). En 1924, Lee y Tannenbaum realizaron el primer estudio exhaustivo de carcinoma inflamatorio donde describieron, en 28 pacientes, las características de esta forma única de cáncer mamario.

Ellos fueron los primeros en introducir el término de “cáncer inflamatorio de mama”, proporcionando además una descripción clínica de la enfermedad. En 1938, Taylor y Meltzer describieron este tipo de neoplasia como una presentación del cáncer de mama única, agresiva y fatal que puede afectar a las mujeres de cualquier edad y de presentación no restringida a la lactación o embarazo. Además, establecieron las dos variedades clínicas principales de esta patología (carcinoma inflamatorio primario y secundario).

Por otro lado, en la especie canina el carcinoma inflamatorio mamario fue descrito por primera vez en 1983 en un estudio clínico y anatomopatológico que incluyó 10 perras con carcinoma inflamatorio mamario (Susaneck *et al.*, 1983). Posteriormente, Pérez-Alenza *et al.* (2001) realizaron un trabajo donde se investigaron las características epidemiológicas, clínicas y patológicas en 33 casos de carcinoma inflamatorio canino. Unos años más tarde, este mismo equipo comenzó a publicar diversos estudios sobre este tipo tan especial de cáncer mamario canino (Illera *et al.*, 2002; Nieto *et al.*, 2002; Peña *et al.*, 2002; Illera *et al.*, 2003; Peña *et al.*, 2003a; Peña *et al.*, 2003b; Silvan *et al.*, 2003; Illera *et al.*, 2006; Sanchez-Archidona *et al.*, 2007). Hasta la aparición de estos estudios, enfocados hacia diversos aspectos como el perfil hormonal, genético e inmunohistoquímico de este tipo de tumor, muy poco se conocía sobre su existencia en la especie canina.

Las únicas especies animales en las que se ha descrito la aparición espontánea de CI son la especie canina (Susaneck *et al.*, 1983) y la felina (Perez-Alenza *et al.*, 2004), especie en la que es muy poco frecuente. Existen pocos estudios de CI canino, por ello, en adelante haremos referencia al CI mamario en la mujer como método orientativo y comparativo con respecto al CI mamario de la especie canina.

1.2. Epidemiología del carcinoma inflamatorio mamario

1.2.1. Carcinoma inflamatorio humano

El carcinoma inflamatorio mamario es un tumor poco frecuente. La prevalencia que se ha indicado en la mujer varía entre el 1 y 6% de todos los cánceres mamarios (Jaiyesimi *et al.*, 1992; Brooks *et al.*, 1998; Chang *et al.*, 1998a; Chang *et al.*, 2000; Wingo *et al.*, 2004). Estos datos de prevalencia varían geográficamente en los diferentes países (Hotes *et al.*, 2004), sin embargo, la proporción de cánceres mamarios que son inflamatorios es generalmente menor en Estados Unidos (1,9%) (Anderson *et al.*, 2005) que en otros países

donde se han realizado estudios similares como en Francia (2,1%) (Tardivon *et al.*, 1997), Turquía (5%) (Gunhan-Bilgen *et al.*, 2002), Túnez (6,2%) (Maalej *et al.*, 1999), Pakistán (12%) (Aziz *et al.*, 2001) y Nigeria (17,5%) (Chiedozi, 1987). En el caso concreto de España, el 2,9% de todos los cánceres mamarios humanos diagnosticados entre los años 1977 y 1993 en el Instituto Valenciano de Oncología se correspondieron con carcinomas inflamatorios mamarios (Ruiz Simón *et al.*, 2000).

Un hecho que ocasiona preocupación en la comunidad científica es el incremento en el número de casos de CI en los últimos años. La incidencia de CI ha incrementado, al menos ligeramente, en las últimas tres décadas (Chang *et al.*, 1998a; Anderson *et al.*, 2005; Hance *et al.*, 2005), aunque parece que más lentamente durante los últimos años (Anderson *et al.*, 2005). Los estudios realizados muestran que de los años 70 a los 90, la incidencia de CI mamario se dobló de 0,3 a 0,7 casos por 100.000 personas-año entre mujeres blancas y de 0,6 a 1,1 en las áfrico-americanas (Chang *et al.*, 1998a). En años posteriores, de los años 90 al año 2000, la incidencia de CI mamario aumentó en 0,5 casos por 100.000 personas-año entre las mujeres de ambas razas (Hance *et al.*, 2005).

El cáncer mamario es una enfermedad generalmente de la mujer, sin embargo puede aparecer también en el varón, incluso se han descrito casos de carcinoma inflamatorio mamario (Treves, 1953). La incidencia de tumores mamarios en la mujer es prácticamente el doble (1%) que en el hombre (0,59%). Asimismo, el carcinoma inflamatorio es más frecuente en la mujer (1,9%) que en el hombre (1,4%) (Chang *et al.*, 1998a; Wingo *et al.*, 2004).

A pesar de que el carcinoma inflamatorio puede aparecer en mujeres de cualquier raza, existen diversos estudios que indican una mayor incidencia de los mismos en las mujeres de raza negra (10,1%), con respecto a mujeres de raza blanca (6,2%) o de otras razas diferentes de blanca y negra (5,1%) (Jaiyesimi *et al.*, 1992; Chang *et al.*, 1998a; Wingo *et al.*, 2004; Hance *et al.*, 2005).

En la mujer, la edad media de mayor riesgo de padecer tumores mamarios es alrededor de los 60 años. Sin embargo, el CI aparece frecuentemente en mujeres más jóvenes, en torno a los 50 años de edad, generalmente más relacionado con el estado pre- o perimenopáusico, que en mujeres con otras formas de tumor mamario. Se ha observado, además, que la incidencia de carcinoma inflamatorio aumenta hasta los 50 años y luego va descendiendo (Kokal *et al.*, 1985; Jaiyesimi *et al.*, 1992; Chang *et al.*, 1998a; Wingo *et al.*,

2004; SEER, 2005). Se han descrito variaciones raciales y de sexo en cuanto a la edad de padecer CI, de manera que las mujeres de raza asiática o negra suelen padecer CI a una edad más joven que las mujeres de raza blanca (Chang *et al.*, 1998a; Wingo *et al.*, 2004; Hance *et al.*, 2005; SEER, 2005) y que los varones que padecen este tipo de cáncer suelen ser de mayor edad (61,9 años) que las mujeres (57 años) (SEER 2005).

Aunque, existe un mayor riesgo de sufrir CI en el periodo peri-menopáusico (Anderson *et al.*, 2005), no está muy claro si este cáncer mamario es más frecuente en el periodo premenopáusico, puesto que existen estudios que muestran una mayor incidencia durante este periodo (Chiedozi, 1987; Chang *et al.*, 1998b), otro estudio muestra mayor incidencia de CI en el periodo post-menopáusico (Mourali *et al.*, 1980) y en otro no encuentran diferencias entre ambos periodos (Aziz *et al.*, 2001). De la misma manera no está muy claro si la edad de la menarquia o la edad del primer parto influyen en el riesgo de padecer CI.

Los estudios iniciales indicaban que el CI estaba asociado con el periodo de embarazo y lactancia (Klotz, 1869; Von Volkmann y Brust, 1875; Schumann, 1911; Learmont, 1916; Ewing, 1934; Mourali *et al.*, 1980; Chiedozi, 1988), sin embargo estudios posteriores sugieren que el CI no es más común durante este periodo en comparación con otros tipos de cáncer mamario (Meyer *et al.*, 1948; Swain y Lippman, 1989; Ibrahim *et al.*, 2000). Por otro lado, en un estudio se observó que el 88% de los casos de CI mamario y el 89% de los casos de tumores mamarios no inflamatorios se produce en mujeres que han estado alguna vez embarazadas (Chang *et al.*, 1998b). Aunque generalmente tener hijos a edad joven protege contra el cáncer mamario (Levine y Veneroso, 2008); un estudio determinó que el desarrollo de CI se encuentra relacionado con la edad a la que se tiene el primer parto y aquellas mujeres que presentan un cáncer mamario agresivo es más frecuente que hayan sido madres de su primer hijo a una edad más joven (21 años) que las que padecen cáncer mamario menos agresivo (23 años) (Chang *et al.*, 1998b). Aunque los resultados del estudio de Chang *et al.* (1998) no fueron significativos, en el año 2001 se publicó otro estudio que obtuvo resultados similares (Aziz *et al.*, 2001) y otro posterior (Levine, 2004) donde sus resultados mostraron que era tres veces más probable que las pacientes con cáncer mamario agresivo (CI y no CI) hubieran sido madres antes de los 20 años que las pacientes con cáncer mamario no agresivo.

A diferencia de lo que ocurre con el resto de cánceres mamarios, donde un elevado índice de masa corporal reduce el riesgo de padecer tumores mamarios (Swanson *et al.*, 1989), parece existir una asociación entre el índice de masa corporal y la aparición de carcinoma inflamatorio mamario. Cuanto mayor es el índice de masa corporal, existe un mayor riesgo de padecer CI (Chang *et al.*, 1998b; Dawood *et al.*, 2008a),

En varios estudios se ha indicado que existe un mayor porcentaje de casos de CI que tienen familiares con antecedentes de cáncer mamario, que aquellos que padecen tumor mamario no CI (Chang *et al.*, 1998b; Aziz *et al.*, 2001).

En un estudio donde se estudió la relación entre el uso de métodos anticonceptivos orales y padecer CI mamario o cáncer mamario no inflamatorio, no se encontraron marcadas diferencias entre ambos grupos, de manera que el 70% de las mujeres con CI y el 72% de las mujeres con tumor mamario no CI tomaban anticonceptivos orales (Chang *et al.*, 1998b).

En un análisis de Estados Unidos se publicó que fumadoras y ex-fumadoras tenían menor riesgo de sufrir CI mamario y que el alcohol no se encontraba relacionado con el riesgo de desarrollar este tipo de cáncer (Chang *et al.*, 1998b).

Por último, se ha asociado una mayor frecuencia de desarrollo de CI mamario a la vida en zonas rurales, en relación con un menor estatus socioeconómico y con una mayor tendencia a amamantar a los hijos (Maalej *et al.*, 1999; Le *et al.*, 2006).

1.2.2. Carcinoma inflamatorio canino

El carcinoma inflamatorio representa el 7,6% de todos los tumores mamarios caninos (incluyendo displasias y resto de neoplasias mamarias) y el 17% de todas las neoplasias mamarias malignas (Pérez-Alenza *et al.*, 2001).

A diferencia de lo que ocurre en la mujer, no se ha encontrado predisposición racial a padecer esta patología en la especie canina; sin embargo, sí que existe relación con la edad al diagnóstico, de manera que la media de edad de pacientes con CI es significativamente mayor (11,4 años) que la de aquellos que presentan otros tipos de tumores mamarios malignos diferentes del CI (9,9 años) (Pérez-Alenza *et al.*, 2001). A pesar de que en un estudio previo se descubrió que el CI aparecía en perras más jóvenes que las que padecían otros tipos de tumores mamarios, los propios autores admitieron que el número de

animales incluido en dicho estudio (10 casos) era pequeño para considerarse representativo (Susaneck *et al.*, 1983).

La aparición del carcinoma inflamatorio canino se asocia con la fase de diestro, momento del ciclo estral en el que los niveles de progesterona son máximos. Sin embargo, la aparición de CI no parece estar relacionada con el hecho de haber recibido tratamientos previos con progestágenos para inhibir el celo (Pérez-Alenza *et al.*, 2001).

Por otro lado, Pérez-Alenza *et al.*, (2001) encontraron diferencias significativas en cuanto a la condición corporal, siendo ésta mayor en las perras con CI que en aquellos con tumores mamarios malignos no carcinoma inflamatorio.

Al igual que en la mujer, la incidencia de CI canino ha aumentado en las últimas décadas. Este fenómeno podría deberse a diferentes factores ambientales que influyen en la aparición de CI humano, y que podrían también influir en el desarrollo de CI en la especie canina (Susaneck *et al.*, 1983; Pérez-Alenza *et al.*, 2001; Peña *et al.*, 2003a).

1.3. Etiopatogenia del carcinoma inflamatorio mamario

Muchos aspectos del carcinoma inflamatorio mamario tanto humano como canino son desconocidos, entre ellos, los mecanismos etiológicos y patogénicos relacionados con la aparición y desarrollo de este tipo de neoplasia. Sin embargo, diferentes estudios indican la existencia de mecanismos patogénicos diferenciales en el carcinoma inflamatorio humano y canino, respecto a otros carcinomas mamarios no inflamatorios, sobre todo en lo que se refiere a la capacidad invasiva (Giordano y Hortobagyi, 2003b; Illera *et al.*, 2006; Sanchez-Archidona *et al.*, 2007).

Como ya se ha indicado, se trata de un tipo especial de tumor mamario con características diferenciales con respecto a otros tumores mamarios desde el punto de vista genético, biológico y clínico (Jaiyesimi *et al.*, 1992; Tavassoli, 1999; Pérez-Alenza *et al.*, 2001; Giordano, 2003a; Charafe-Jauffret *et al.*, 2008). Por ello, diferentes alteraciones epidemiológicas, clínicas, patológicas y genéticas se han asociado con el carcinoma inflamatorio mamario en la mujer y en la perra con respecto a otros tumores mamarios no inflamatorios (van Golen *et al.*, 1999; Pérez-Alenza *et al.*, 2001; Kleer *et al.*, 2002).

Ambas especies podrían estar influenciadas por los mismos carcinógenos ambientales y nutricionales ya que el perro, como animal de compañía, comparte muchos aspectos de la vida del propietario (Peña *et al.*, 2003a).

1.3.1. Carcinoma inflamatorio humano

Desde el punto de vista genético, existen diversos estudios, que investigan la implicación de diferentes genes en el desarrollo del CI en la mujer. En los últimos años se ha observado que algunas alteraciones genéticas específicas, como un incremento en la expresión del gen que codifica la *RhoC* GTPasa y una pérdida de expresión del gen denominado “perdido en el cáncer inflamatorio mamario” (*Lost in Inflammatory Breast Cancer*, LIBC) están muy correlacionadas con un fenotipo altamente agresivo de este tipo de enfermedad (van Golen *et al.*, 1999; van Golen *et al.*, 2000a; Kleer *et al.*, 2002) y con un incremento de la angiogénesis (van Golen *et al.*, 2000b).

Se ha observado un aumento en la expresión de *E-cadherina* (glicoproteína transmembrana que mantiene las uniones de las células epiteliales entre sí) en el CI de la mujer, en comparación con otros tumores mamarios no CI (Kleer *et al.*, 2001).

Con respecto al gen de p53 (gen relacionado con la supresión tumoral), Aziz *et al.*, señalaron en el año 2001, que las mutaciones de p53 eran más frecuentes en los CI con respecto a otros cánceres mamarios diferentes del CI.

Por otra parte, tanto la glándula mamaria normal como la neoplásica ha sido considerada por muchos autores como un tejido endocrino (Vermeulen *et al.*, 1986; Thijssen *et al.*, 1991; Blankenstein *et al.*, 1999; Liao y Dickson, 2002) y en varios estudios se ha indicado que los estrógenos producidos localmente en el cáncer mamario pueden contribuir a la progresión tumoral (Vermeulen *et al.*, 1986; Blankenstein *et al.*, 1999). Además, el carcinoma inflamatorio parece presentar mecanismos endocrinos de regulación distintos a otros tipos de cáncer de mama, tanto en la mujer como en la perra (van Golen *et al.*, 1999).

1.3.2. Carcinoma inflamatorio canino

En diversos estudios se ha demostrado que en el CI canino existe un mecanismo endocrino especial; los CI contienen niveles elevados de hormonas esteroides (progesterona, estradiol, testosterona, sulfato de estrona, androstenediona y dehidroepiandrosterona), en comparación con tumores mamarios no CI, y se ha propuesto que estas hormonas actúan de forma autocrina y paracrina (Illera *et al.*, 2003; Peña *et al.*, 2003a; Peña *et al.*, 2003b; Illera *et al.*, 2006; Sanchez-Archidona *et al.*, 2007; Queiroga *et al.*, 2008). Con respecto a la expresión inmunohistoquímica de los receptores de hormonas

esteroides, los CI caninos son negativos (100%) al receptor de estrógenos alfa (RE α) (Pérez-Alenza *et al.*, 2001; Peña *et al.*, 2003a), positivos al receptor de estrógenos beta (RE β) (100%) incluso en los émbolos tumorales de los vasos linfáticos (Illera *et al.*, 2006). Los CI caninos son positivos en un 55-71% al receptor de progesterona (RP) (Pérez-Alenza *et al.*, 2001; Peña *et al.*, 2003a), y positivos en un 93% de los casos al receptor de andrógenos (RA), aunque la inmunexpresión es heterogénea (Illera *et al.*, 2006).

1.4. Clasificación del carcinoma inflamatorio mamario

Inicialmente, el carcinoma inflamatorio mamario estaba designado como **Estadio D** dentro del sistema de clasificación denominado *Columbia Clinical Classification System* propuesto por Haagensen y Scout en el año 1943. Este sistema estaba basado en las características clínicas del tumor y las neoplasias se clasificaron en cuatro Estadios, A, B, C y D. Los tumores incluidos dentro de los tres primeros estadios se consideraban operables y los del estadio D inoperables. Sin embargo, este modelo no se ha usado durante mucho tiempo y actualmente existen otros dos sistemas para categorizar el CI (Walshe y Swain, 2005).

La clasificación empleada por el Instituto Gustave-Roussy desde el año 1959, que clasifica el cáncer de mama con el criterio *poussée évolutive* (PEV), se basa en el ritmo de desarrollo del tumor y la extensión de mama afectada. Este sistema clasifica los tumores clínicamente en cuatro categorías:

1. PEV 0: Tumor sin aumento del volumen durante los últimos 3 meses y sin signos de inflamación.
2. PEV 1: Tumor con marcado incremento de volumen durante los 3 meses previos pero sin signos de inflamación.
3. **PEV 2:** Tumor en el cual el tejido mamario, particularmente la piel, es afectada por signos de inflamación y edema que afecta a menos de la mitad de la superficie mamaria.
4. **PEV 3:** Tumor con signos de inflamación aguda y edema y que afecta a más de la mitad de la superficie mamaria.

Dentro de esta clasificación el CI está incluido dentro de la categoría PEV 2 o PEV 3 (Denoix, 1970; Mourali *et al.*, 1977; Tabbane *et al.*, 1977). Sin embargo, esta clasificación no se usa de forma mayoritaria (Walshe y Swain, 2005).

Hoy en día se utiliza más frecuentemente el sistema Tumor-Node-Metastases (TNM) descrita por el *American Joint Committee in Cancer* (AJCC) en su *Manual for Staging of Cancer* editado en el año 1988 y reeditado en el año 2002 (Greene *et al.*, 2002; Singletary *et al.*, 2002; Sobin y Wittekind, 2002). Este sistema se describe a continuación:

- T (Tumor):
 - T1: Tumor de 2 cm o menos con o sin fijación al músculo
 - T2: Tumor de 2 a 5 cm con o sin fijación al músculo
 - T3: Tumor >5cm con o sin fijación al músculo
 - **T4:** Tumor de cualquier tamaño con extensión directa a la pared del torax o a la piel, sólo como se describe a continuación:
 - T4a: extensión a la pared del tórax sin incluir los músculos petorales
 - T4b: Edema (incluyendo piel de naranja) o ulceración de la piel de la mama, o nódulos de la misma mama invadidos
 - T4c: T4a y T4b
 - T4d: **Carcinoma Inflamatorio**
- N (Node, Ganglio):
 - N0: Ganglio axilar homolateral no palpable
 - N1: Ganglio axilar homolateral móvil
 - N2: Ganglio axilar homolateral fijado a una o varias estructuras
 - N3: Ganglio supraclavicular o infraclavicular afectado o edema del brazo homolateral
- M (Metástasis):
 - M0: no metástasis a distancia
 - M1: metástasis a distancia

Teniendo en cuenta esta clasificación, el carcinoma inflamatorio mamario es designado como un tumor T4d y estadio IIIB (cualquier T, N3; cualquier T4, cualquier N (Todos M0)).

1.5. Características clínicas del carcinoma inflamatorio mamario

1.5.1. Carcinoma inflamatorio humano

A diferencia de lo que ocurre en pacientes con otros tipos de cáncer mamario, en los que suele detectarse un nódulo en la mama sin que produzca dolor, el paciente con CI frecuentemente experimenta síntomas de dolor, pesadez y quemazón de la mama previamente a la aparición de los signos clínicos. Después de estas primeras manifestaciones, por definición, la enfermedad progresa rápidamente de manera que el intervalo de tiempo entre estos síntomas y los signos clínicos es corto (Walshe y Swain, 2005).

En el año 1956, Haagensen describió las características clínicas que justifican la designación de esta neoplasia como “inflamatoria”, y que hoy en día se siguen considerando para el diagnóstico clínico del CI. Los pacientes con CI, típicamente presentan un aumento brusco del tamaño de la mama, dolor, firmeza, engrosamiento, calor y sensibilidad, edema y eritema de la piel que recubre la región mamaria (Haagensen, 1956; Jaiyesimi *et al.*, 1992). **Figuras 1 y 2.**

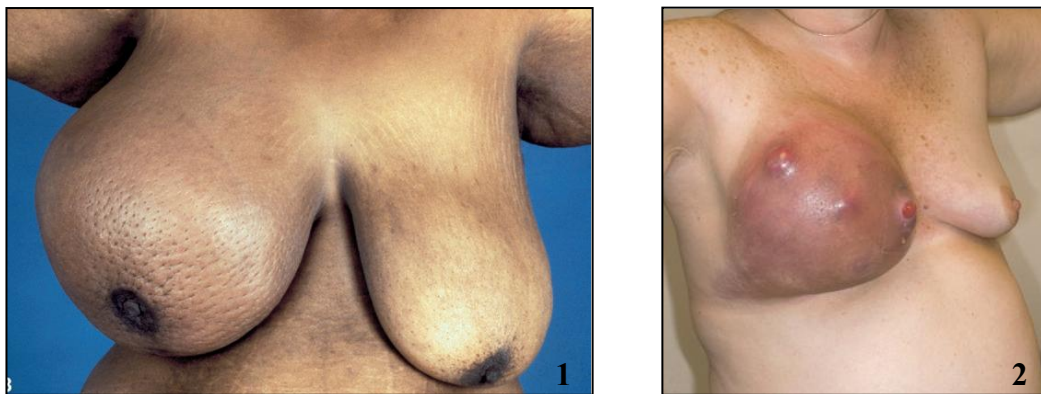


Figura 1. Signos clínicos de CI mamario de la mujer. Rápido aumento de tamaño y apariencia de piel de naranja de la región mamaria. Imagen tomada de *Singletary y Cristofallini, 2008*. **Figura 2.** Apariencia clínica de CI mamario humano con edema, inflamación y eritema. Imagen tomada de *Woodward y Buchholz, 2008*.

Estos síntomas, en muchas ocasiones han llevado a errores diagnósticos por confundirse con alguna lesión benigna como mastitis o abscesos mamarios (Dahlbeck *et al.*, 1995). La firmeza, sensibilidad, edema cutáneo, eritema y dolor suelen abarcar una cuarta parte, la mitad o la mama completa, aunque en algunos casos se ve afectada en menos de un tercio, siendo, sin embargo, el pronóstico grave (Piera *et al.*, 1986). Por otro

lado, aunque se pueden observar regiones eritematosas cutáneas en otros tumores localmente avanzados, a diferencia del CI, nunca afectan a más de un tercio de la mama (Walshe y Swain, 2005). Otros síntomas menos comunes son dolor axilar, picor en el pezón, edema del brazo y dolor óseo (Jaiyesimi *et al.*, 1992).

Los cambios que se producen en la piel de la mama suelen ser la primera manifestación de CI y éstos cambian tanto en color como en patrón de distribución, dependiendo de la extensión de la enfermedad. En las primeras etapas, el eritema de la piel es más evidente en la mitad inferior de la mama. Cuando la enfermedad va progresando, el color de la piel cambia, se va oscureciendo pasando de un tono rosado hasta un tono rojizo o púrpura similar a un proceso de equimosis y se va extendiendo difusamente por toda la glándula mamaria (Bland y Copeland, 1991; Jaiyesimi *et al.*, 1992). Estos cambios de color son más difíciles de apreciar en pieles oscuras, quizás por eso existe una alta proporción de mujeres de raza negra que presentan la enfermedad muy avanzada y con un peor pronóstico en el momento en que se diagnostica el CI (Swain y Lippman, 1989; Hunter *et al.*, 1993; Walshe y Swain, 2005).

El crecimiento rápido de la mama es un signo patognomónico del carcinoma inflamatorio mamario y tiene lugar al mismo tiempo que los cambios que se producen en la piel de la mama. El aumento del tamaño de la mama suele ser de 2 a 3 veces su tamaño original en pocas semanas (Walshe y Swain, 2005). Los síntomas clínicos progresan tan rápidamente, que muchos pacientes solicitan atención médica antes que aquellos con otros tumores mamarios distintos del carcinoma inflamatorio (Jaiyesimi *et al.*, 1992).

Aunque no es una característica principal del CI, en algunas ocasiones también se afecta el pezón. Tampoco suele ser frecuente la aparición de úlceras, siendo éstas más comunes en casos de cáncer de mama localmente avanzado no inflamatorio (Walshe y Swain, 2005). Por el contrario, sí es frecuente que se produzcan metástasis al ganglio axilar ipsilateral, y como consecuencia de ello dicho ganglio se hace palpable (Lee y Tannenbaum, 1924; Taylor y Meltzer, 1938; Levine *et al.*, 1985; Hance *et al.*, 2005).

Aunque esta patología puede afectar tanto a la mama derecha como la izquierda, algunos artículos describen una tendencia a la aparición del CI en la mama izquierda (Meyer *et al.*, 1948; Bozzetti *et al.*, 1981; Dershaw *et al.*, 1994). En ausencia de tratamiento, la enfermedad progresa y afecta a la mama opuesta y al ganglio axilar contralateral. Incluso, aunque no es frecuente, se ha descrito la aparición simultánea de

carcinoma inflamatorio en ambas mamas (Agrawal *et al.*, 2003). La mayoría de los pacientes tienen los ganglios axilares palpables y afectados por metástasis y aproximadamente el 20-30% presentan metástasis a distancia (Singletary y Cristofanilli, 2008).

Debido a que en esta patología no se produce un verdadero fenómeno inflamatorio, no suelen encontrarse signos sistémicos clásicos de inflamación como fiebre o leucocitosis; sin embargo, éstos generalmente aparecen asociados a procesos como mastitis infecciosa o abscesos mamarios (Jaiyesimi *et al.*, 1992; Walshe y Swain, 2005).

Formas clínicas de presentación

En el año 1938, Taylor y Meltzer sugirieron la primera diferenciación clínica del carcinoma inflamatorio mamario, cuando describieron dos variedades clínicas de los cambios que se producían en la mama cancerígena. Describieron dos tipos de carcinoma inflamatorio, primario y secundario:

- Primario: aquél que se caracteriza por la aparición súbita de los síntomas clásicos de esta patología en una mama que previamente era normal. Frecuentemente no aparece tumor mamario palpable en el momento de la presentación. Si hay tumor presente, no suele estar bien delimitado. Lo más común es que el enrojecimiento y el edema cubran más de un tercio de la piel de la mama. El ganglio axilar ipsilateral suele estar afectado y palpable.
- Secundario: aquél en el que los síntomas característicos de la enfermedad aparecen en una mama que previamente ya tiene un proceso cancerígeno no operado ó posteriormente a una mastectomía ó en la mama contralateral ó, menos frecuentemente, en forma de recurrencia cutánea a distancia. Clínicamente, la recidiva de un carcinoma mamario en forma de cáncer inflamatorio se caracteriza por la misma coloración y edema que se observa en los CI primarios. El curso clínico y el comportamiento es prácticamente igual que para el caso de los primarios.

1.5.2. Carcinoma inflamatorio canino

Los síntomas clínicos característicos del carcinoma inflamatorio en la perra incluyen un desarrollo rápido de la enfermedad en las glándulas mamarias afectadas que va acompañado de edema, eritema, endurecimiento, calor y signos de dolor. Estos signos, en muchas ocasiones llevan a errores de diagnóstico, pudiendo confundirse con procesos benignos como mastitis, dermatitis o abscesos (Susaneck *et al.*, 1983; Pérez-Alenza *et al.*, 2001). Generalmente se ven afectadas múltiples mamas (con o sin formación de nódulo); sin embargo, es difícil delimitar las glándulas mamarias afectadas por el proceso, debido a la naturaleza difusa del tumor y al edema que le acompaña. Incluso, en algunas ocasiones el proceso tumoral se extiende hacia las extremidades (Susaneck *et al.*, 1983; Pérez-Alenza *et al.*, 2001). En el único trabajo donde se han valorado estos aspectos, todas las perras con CI presentaron los signos clínicos en más de una glándula mamaria y en un 55% de los casos, existía una afectación de ambas cadenas mamarias (Pérez-Alenza *et al.*, 2001). Además, el 60% de los animales mostraron signos de edema de extremidad, que provocaba cojera de la extremidad afectada (Pérez-Alenza *et al.*, 2001). Frecuentemente (60%), se observa en la exploración física un aumento del tamaño de los nódulos linfáticos regionales (axilar y/o inguinal). Además, las perras con CI suelen presentar anorexia, debilidad generalizada, pérdida de peso, polidipsia y poliuria, síntomas mucho menos frecuentes en perras con tumores mamarios caninos distintos al carcinoma inflamatorio (Pérez-Alenza *et al.*, 2001).

A pesar de que no existe ningún estudio en profundidad acerca de las alteraciones laboratoriales que se producen en los animales que padecen CI, parece que existen ciertas alteraciones en los factores de coagulación en alguno de estos casos (Susaneck *et al.*, 1983; Pérez-Alenza *et al.*, 2001). Estas alteraciones hemostáticas sí han sido observadas en perros con carcinoma mamario avanzado no carcinoma inflamatorio (Stockhaus *et al.*, 1999).

Formas clínicas de presentación

En el caso de la especie canina y de forma similar a la mujer, en el año 2001 Pérez-Alenza *et al.* definieron dos formas clínicas de presentación del CI, teniendo en cuenta la historia clínica previa de patología mamaria. Estos autores describieron dos tipos de CI, primario y secundario.

- CI primario: aquél que se desarrolla de forma repentina, sin historia previa de tumores mamarios. Parece que este tipo es más agresivo que el secundario, presentando un crecimiento más rápido.
- CI secundario: aquél que se desarrolla en un animal que tenía tumores mamarios previamente en la zona afectada. Este tipo es ligeramente más común que el primario, aunque menos agresivo. El carcinoma inflamatorio mamario canino secundario, a su vez se divide en:
 - *No post-quirúrgico*: existe un nódulo mamario no sometido a cirugía, a partir del cual, comienza a desarrollar las características clínicas de carcinoma inflamatorio.
 - *Post-quirúrgico*: consiste en la aparición de una recidiva de un tumor mamario operado previamente, en forma de carcinoma inflamatorio.

1.6. Características histopatológicas del carcinoma inflamatorio mamario

1.6.1. Carcinoma inflamatorio humano

El carcinoma inflamatorio no se corresponde con un tipo histológico específico de cáncer mamario en la mujer (Taylor y Meltzer, 1938; Pérez-Mesa, 1967; Haagensen, 1971; Saltzstein, 1974; Droulias *et al.*, 1976). La presentación del carcinoma inflamatorio mamario se ha asociado normalmente con el tipo histológico carcinoma ductal infiltrativo (casi siempre bien diferenciado), pero además se han asociado otros tipos como carcinoma lobular infiltrativo, carcinoma medular, carcinoma de células pequeñas y carcinoma de células largas indiferenciadas (Jaiyesimi *et al.*, 1992; Resetkova, 2008). La experiencia del Centro Médico Anderson (Texas), refleja que el tipo de carcinoma que más frecuentemente se asocia con el CI mamario es multicéntrico y con un patrón de arquitectura micropapilar, al menos de forma focal, y con una extensa invasión linfática en la zona peritumoral (Resetkova, 2008). Sobre dos tercios de los casos de CI son de alto grado de malignidad histológica, una proporción mayor de la que se observa en casos de tumores mamarios no CI (Delarue *et al.*, 1981; Jaiyesimi *et al.*, 1992), con células tumorales pleomórficas y figuras mitóticas atípicas (Rosen, 1996).

Inicialmente, la descripción patológica de esta enfermedad se vio influenciada por la necesidad de explicar los hallazgos clínicos característicos del CI (Grace y Cooperman,

1985). Bryant en el año 1887, fué el primero en observar una invasión de los vasos linfáticos de la dermis por émbolos carcinomatosos. Tras este hallazgo, Bryant hipotetizó que la obstrucción causada por la invasión tumoral de los vasos linfáticos producía las características clínicas típicas de los pacientes con CI mamario como eritema, calor, aumento difuso del tamaño, dolor, firmeza y edema. Teniendo en cuenta este descubrimiento, Ellis y Teitelbaum propusieron en el año 1974, que el carcinoma inflamatorio mamario sería categorizado patológicamente en base a un “distintivo histológico” como la presencia de émbolos tumorales en los vasos linfáticos de la dermis, sugiriendo así que la enfermedad cambiara su nombre de carcinoma inflamatorio por el de “carcinomatosis linfática dermal”. Sin embargo, posteriormente se han publicado diversos estudios en los que se demuestra que los émbolos tumorales en los vasos linfáticos de la dermis no están presentes en todos los casos de pacientes de CI mamario, si no que aparecen en un 50-75% de las pacientes (Charpin *et al.*, 1992; Bonnier *et al.*, 1995; Resetkova, 2008). La dilatación de los vasos linfáticos tiende a ser prominente en la dermis papilar y reticular, y la dispersión de los émbolos tumorales puede comenzar a ser evidente a nivel de la dermis (Resetkova, 2008). Por otro lado, Salzstein describió en el año 1974 el término de “carcinoma inflamatorio oculto”, que hace referencia a un CI en el que la afectación de los vasos linfáticos de la dermis se confirma mediante examen histológico, pero, sin embargo, no existen signos clínicos de inflamación. Este tipo de CI oculto parece ser que precede a la presentación clínica característica de CI (Saltzstein, 1974).

Por otro lado, se puede observar microscópicamente la invasión de la dérmis por parte del carcinoma fuera de los vasos linfáticos, característica que no es muy común en el CI mamario primario, pero sí es más frecuente en el CI secundario (Kleer *et al.*, 2000).

A pesar del nombre por el que se le conoce, el carcinoma inflamatorio de mama no tiene evidencias patológicas de inflamación, rara vez se puede observar un infiltrado inflamatorio de linfocitos y monocitos en las zonas perivasculares como respuesta al bloqueo linfático por las células tumorales. La cantidad de citocinas producidas por el tumor es insignificante y la aparición de neutrófilos, eosinófilos o mastocitos, no es común en el estroma peritumoral (Kleer *et al.*, 2000; Resetkova, 2008).

La piel mamaria de los pacientes con CI muestra a menudo alteraciones histológicas, como un ensanchamiento de la capa dérmica del colágeno reticular, debido a un incremento del colágeno y del edema (Resetkova, 2008).

1.6.2. Carcinoma inflamatorio canino

El carcinoma inflamatorio en la especie canina, al igual que ocurre en la mujer, se corresponde con varios tipos histológicos: carcinomas simples (tubulares, sólidos y papilares), carcinomas adenoescamosos y carcinomas ricos en lípidos (Pérez-Alenza *et al.*, 2001; Peña *et al.*, 2003a). A pesar de que el carcinoma rico en lípidos es un tumor poco frecuente, la proporción de CI caninos ricos en lípidos es elevada. El diagnóstico de carcinoma rico en lípidos se establece cuando más de un 80% de las células del tumor son productoras de lípidos y presentan el citoplasma ocupado por una o varias gotas lipídicas que son positivas a la técnica de tinción de Sudan III y negativas a la de Carmín de Best, confirmandose la naturaleza lipídica de esta secreción. Los carcinomas ricos en lípidos presentan las células en disposición tubular (adenocarcinomas). Aproximadamente, en el 70% de los CI no diagnosticados como carcinomas ricos en lípidos, también es frecuente encontrar grupos de células con una distribución multifocal, que presentan gotas de lípidos en su citoplasma, aunque en estos casos el número no supera el 80% establecido (Peña *et al.*, 2003a).

Todos los carcinomas inflamatorios mamarios caninos son de elevada malignidad histológica como se describe a continuación y se clasifican con el grado histológico de malignidad (GHM) más elevado (GHM III). Presentan una formación de túbulos y pleomorfismo variables. En en 40% de los casos, se pueden encontrar células tumorales gigantes multinucleadas. El índice mitótico es todos los casos es elevado y en un 70% de los casos se observan mitosis atípicas. Las áreas de necrosis están presentes en la mitad de los casos de CI y pueden ser moderadas o extensas (25% de los casos respectivamente). En el 35% de los CI se observan unas estructuras conocidas como “comedocarcinomas”, que se encuentran formados por una zona de necrosis central en el interior de una formación tubular tumoral. También se suele observar una marcada fibrosis perivascular alrededor de los vasos linfáticos (50% de los casos) y en ocasiones (30%), existen hemorragias evidentes (Peña *et al.*, 2003a).

En cuanto a la presencia de células inflamatorias (linfocitos, células plasmáticas y macrófagos), y excluyendo las áreas ulceradas, ésta es moderada en el 85% de los casos y escasa en el resto, observándose en la zona perivascular y perilinfática e infiltrando la dermis (Susaneck *et al.*, 1983; Peña *et al.*, 2003a).

En la piel afectada, se observa frecuentemente hiperplasia e hiperqueratosis de la epidermis y queratosis de los folículos pilosos (Peña *et al.*, 2003a). El tumor invade la dermis en el 82% de los casos (Peña *et al.*, 2003a) y se observan émbolos tumorales en los vasos linfáticos de la dermis en el 74% al 90% de los casos (Susaneck *et al.*, 1983; Pérez-Alenza *et al.*, 2001; Peña *et al.*, 2003a). Los vasos linfáticos que no presentan émbolos, suelen aparecer dilatados (linfangectasias) y existe edema en la dermis (Peña *et al.*, 2003a).

Según describieron Peña *et al.* (2003a), se distinguen dos patrones histológicos diferentes de infiltración de la neoplasia en la dermis: un patrón túbulo-papilar con estructuras tubulares o papilares bien definidas (62%) y un patrón sarcomatoso, caracterizado por una infiltración difusa formada por células independientes de elevada malignidad histológica (anaplásicas), de aspecto similar a un sarcoma (37%). Este tipo histológico de infiltración de la dermis se asocia estadísticamente con el tipo clínico de CI mamario canino (primario o secundario). Así, el CI primario presenta generalmente el tipo histológico de infiltración sarcomatosa, que es el de mayor malignidad histológica. El patrón de invasión de la dermis es sarcomatoso en algunos carcinomas inflamatorios mamarios diagnosticados como carcinomas de tipo tubular o papilar, incluyendo los carcinomas ricos en lípidos. En estos últimos, el área de invasión tumoral en la dermis ofrece una imagen muy semejante a un liposarcoma. Sin embargo, el tipo histológico de invasión en la dermis coincide siempre con el tipo de invasión observado en el tejido adiposo y muscular de la región mamaria y de las extremidades. El tejido muscular infiltrado por la neoplasia suele presentar degeneración (depósito de sustancia hialina), atrofia o necrosis, y mostrar un grado variable de edema intersticial y de células inflamatorias (macrófagos y linfocitos) como parte de la reparación tisular. El músculo necrosado se sustituye frecuentemente por tejido adiposo.

En todos los casos se observan metástasis en los ganglios regionales (Susaneck *et al.*, 1983; Pérez-Alenza *et al.*, 2001; Peña *et al.*, 2003a). En algún caso, la metástasis es tan agresiva que reemplaza totalmente el tejido linfoide. En los carcinomas ricos en lípidos, las células con vacuolas lipídicas se observan metastatizando en los ganglios, pero en ningún caso se observan en las metástasis pulmonares (Peña *et al.*, 2003a).

1.7. Diagnóstico del carcinoma inflamatorio mamario

1.7.1. Carcinoma inflamatorio humano

Frecuentemente, los signos clínicos del carcinoma inflamatorio mamario se encuentran asociados a la invasión de células neoplásicas en los vasos linfáticos de la dermis (Lee y Tannenbaum, 1924). Sin embargo, las características clínicas y patológicas no siempre aparecen al mismo tiempo (Bedwinek *et al.*, 1982). La inconsistente presencia de émbolos tumorales en los vasos linfáticos de la dermis, ha permitido a muchos autores refutar la fiabilidad de esta característica histopatológica, y a considerar a ésta como una prueba patológica adicional que resulta útil para confirmar la presencia de CI, pero que no descarta la existencia de la enfermedad en el caso de que no se observen (Taylor y Meltzer, 1938; Meyer *et al.*, 1948). Además, muchos autores han mostrado que, a pesar de que no exista evidencia patológica, los pacientes que presentan únicamente los signos clínicos clásicos del CI también progresan rápidamente (Lucas y Perez-Mesa, 1978; Bonnier *et al.*, 1995), de manera que el diagnóstico de CI podría basarse tanto en el criterio clínico como histopatológico (Lucas y Perez-Mesa, 1978).

En la actualidad, el diagnóstico de CI se basa en la presencia de sus características clínicas (Cariati *et al.*, 2005). La sospecha clínica de CI aparece cuando un paciente presenta los síntomas clásicos de la enfermedad; aunque, la confirmación histológica de cáncer mamario es esencial. La aspiración con aguja fina o aguja gruesa (biopsia *core-needle*) de la mama o de la piel de zonas representativas de induración generalizada, edema o enrojecimiento, suelen confirmar el diagnóstico. Sin embargo, es más útil para el diagnóstico de carcinoma inflamatorio mamario la realización de una biopsia incisional, para poder obtener muestras adecuadas de tumor o de la piel y de los vasos linfáticos (Jaiyesimi *et al.*, 1992; Walshe y Swain, 2005).

La mamografía tiene un valor limitado; mediante esta técnica se suele observar un aumento del tamaño de la mama y del grosor de la piel, un ensanchamiento asimétrico de los vasos linfáticos subcutáneos y un incremento de la densidad del tejido mamario afectado (Berger, 1962; Chow, 2005). No suele apreciarse masa o ésta puede estar enmascarada por los cambios que existen a su alrededor (Chow, 2005). Por tanto, es muy difícil, si no imposible, diferenciar entre carcinomas inflamatorios y no inflamatorios mamarios únicamente mediante mamografía (Jaiyesimi *et al.*, 1992).

Por otro lado, para el diagnóstico del CI mamario se utilizan otras técnicas de diagnóstico por imagen como la ecografía, donde se aprecia un engrosamiento de la piel, edema, dilatación de vasos linfáticos, y en algunas ocasiones, presencia de una masa irregular. Asimismo, también se utilizan resonancia magnética, tomografía axial computerizada y tomografía de emisión de positrones, técnicas con las que se puede apreciar con mayor claridad la extensión del tumor. Sin embargo, no existe ninguna imagen patognomónica de esta enfermedad (Chow, 2005).

Diagnóstico diferencial

Existen numerosas enfermedades que podrían confundirse clínicamente con el carcinoma inflamatorio mamario, lo que da lugar a un retraso en el diagnóstico y tratamiento del mismo (Jaiyesimi *et al.*, 1992). El principal diagnóstico diferencial en la mujer joven es mastitis o absceso mamario, que frecuentemente aparecen durante el periodo de lactación y cursan con una presentación similar al CI, con dolor de la mama, enrojecimiento, inflamación, etc. Sin embargo, en las pacientes con mastitis o abscesos mamarios suelen aparecer síntomas de fatiga, fiebre y leucocitosis, síntomas que no aparecen frecuentemente en los casos de CI. Además, en procesos de mastitis o abscesos, la piel de la mama es lisa, tierna y brillante, mientras que en el CI aparece rugosa y edematosa (“piel de naranja”). Cuando el endurecimiento de la mama se debe a una mastitis o absceso, éstos mejorarán en unos días con el tratamiento. Sin embargo, cuando los síntomas persisten más de dos semanas, se debe sospechar de un proceso cancerígeno y realizar biopsia incisional. Las ectasias ductales también pueden confundirse con CI mamario, aunque la inflamación es mucho más localizada y responde rápidamente al tratamiento, a diferencia de los casos de CI (Jaiyesimi *et al.*, 1992; Resetkova, 2008).

También es importante diferenciar un CI de un carcinoma mamario localmente avanzado (*locally advance breast carcinoma*, LABC), puesto que el tratamiento debe ser diferente y el pronóstico de LABC es mucho mejor. Es la patología más difícil de diferenciar clínicamente del CI, porque muestran características clínicas similares. Sin embargo, las características histológicas son diferentes, de manera que los tumores denominados LABC no tienen invasión linfática, son más circunscritos y no suelen tener afectación de los ganglios regionales (Resetkova, 2008). Otras características como una mayor edad al diagnóstico, un menor grado de malignidad tumoral y ser positivos al receptor de estrógenos, son compatibles con LABC más que con CI (Anderson *et al.*, 2003). Además, Walshe (2005,2006) ha descrito que el CI se puede distinguir de cualquier

otro tipo de cáncer mamario localmente avanzado por su rápida progresión (normalmente en un intervalo de 10 semanas), junto con la presencia de eritema en más de un tercio de la piel de la región mamaria.

Otros diagnósticos diferenciales a tener en cuenta son: 1) Linfomas o leucemias que afectan a la región mamaria. Son clínicamente difíciles de distinguir del CI. La mama no suele ser una localización primaria en casos de linfoma (<0,5%), es más común que se afecte de manera secundaria. Para obtener el diagnóstico preciso, se requiere un estudio citológico o histológico (Cohen y Brooks, 1991; Sabate *et al.*, 2002). 2) El denominado “carcinoma en cuirasse”, o “Panzerkrebs”, que cursa con un enrojecimiento de la piel, pero que se diferencia de los casos de CI mamario en que cursa sin signos de inflamación aguda y su crecimiento es lento y discontinuo. 3) Erisipelas que afectan a la glándula mamaria. Son poco frecuentes pero cuando aparecen son clínicamente indistinguibles de un CI. Suelen acompañarse de fiebres altas, resfriado y malestar. 4) Tuberculosis mamaria. También es poco frecuente, puede causar cambios inflamatorios en la mama, pero el desarrollo es muy lento y no produce dolor (Jaiyesimi *et al.*, 1992; Resetkova, 2008). 5) Enfermedad de Paget o del pezón, se trata de un cáncer poco común y que presenta signos iniciales similares al CI, pero cuyo progreso es lento y suele afectar sólo a la areola (Resetkova, 2008). 6) Dermatitis por radiación. En estos casos aparecen cambios en la piel similares a los producidos por el CI, a las 2-3 semanas de terapia. Sin embargo, los cambios de la piel afectan sólo a las zonas irradiadas y se resuelven después de 2 o 3 semanas (Lopez *et al.*, 2005). 7) Reacciones alérgicas. Ciertos irritantes químicos nocivos pueden producir reacciones alérgicas que confieren a la piel apariencia parecida al CI, pero al retirar dichos irritantes, desaparece el problema de la piel (Resetkova, 2008). 8) Fallo cardiaco. Se han descrito algunos casos de hinchazón unilateral mamaria debido a un fallo cardiaco congestivo. Estos pacientes pueden presentar signos clínicos y alteraciones mamográficas inespecíficas similares a un CI. Cuando el problema cardiaco es tratado, desaparecen tanto la sintomatología clínica como radiológica (Oraedu *et al.*, 2001).

1.7.2. Carcinoma inflamatorio canino

El diagnóstico del carcinoma inflamatorio mamario en la perra se basa en la presencia de los síntomas característicos, según describió Susaneck *et al.*, en 1983. Así, se sospecha de CI en aquellos animales en los que se produce un rápido crecimiento del proceso tumoral en la región mamaria, que afecta a la piel y el tejido subcutáneo y que suele afectar

a múltiples glándulas mamarias (con o sin presencia de nódulo mamario), con endurecimiento, engrosamiento, edema, eritema, calor y dolor en las zonas afectadas. Sin embargo, en muchas ocasiones el diagnóstico clínico es difícil, especialmente al inicio de la enfermedad. La existencia de alteraciones sistémicas que se reflejan en signos como pérdida de peso, dolor en el examen físico y cojera, pueden ayudar a establecer el diagnóstico clínico de CI, puesto que estos síntomas no son comunes en perros con otros tumores mamarios malignos (Pérez-Alenza *et al.*, 2001).

El diagnóstico histopatológico está basado en una característica exclusiva de este tipo tumoral, que es la presencia de émbolos tumorales en los vasos linfáticos de la dermis superficial. El estudio citológico mediante aspiración por aguja fina revela la presencia de células epiteliales malignas y por tanto, contribuye al diagnóstico de CI descartando procesos benignos como mastitis o dermatitis, sin embargo, ésta técnica no es suficiente para confirmar la enfermedad, porque no revela la afectación linfática característica del CI mamario (Pérez-Alenza *et al.*, 2001). Por otro lado, se debe tener en cuenta que existe un pequeño porcentaje (10-15%) de casos de CI mamario canino en los que no aparece invasión linfática por parte de las células neoplásicas (Susaneck *et al.*, 1983; Pérez-Alenza *et al.*, 2001).

Diagnóstico diferencial

En numerosas ocasiones, el diagnóstico del carcinoma inflamatorio mamario canino, no se realiza correctamente debido a que el proceso se puede confundir con una mastitis o dermatitis mamaria. Asimismo, en ocasiones el diagnóstico histológico puede ser erróneo, si no se observan los émbolos tumorales en los vasos linfáticos de la dermis superficial (Pérez-Alenza *et al.*, 2001).

1.8. Factores pronóstico del carcinoma inflamatorio en la mujer y en la perra

Hasta la aparición de los tratamientos multimodales para el CI de la mujer, la mayor parte las pacientes no sobrevivían más de 5 años a esta enfermedad. El pronóstico de las mujeres con CI mamario es todavía muy pobre, siendo los tiempos de supervivencia en torno a los 3 años, en un 32-42% de los casos (Chang *et al.*, 1998a). En el caso del carcinoma inflamatorio mamario canino no existen estudios pronóstico como ocurre en la mujer, debido a que el pronóstico es aún peor, con unos tiempos de supervivencia de 25 días de media tras el diagnóstico (Pérez-Alenza *et al.*, 2001). Por ello, en este apartado se mencionan fundamentalmente cuales son los factores pronóstico del CI de la mujer.

1.8.1. Edad

La supervivencia total (ST) y el tiempo libre de enfermedad (TLE) de las mujeres con CI mamario, es menor para las mujeres de avanzada edad (>50 años) que para las más jóvenes (Palangie *et al.*, 1994).

En la perra se desconoce si la edad afecta en el pronóstico, ésta podría tener un papel diferente en la mujer con cáncer mamario que en la perra con tumores mamarios; varios estudios han mostrado que la edad es un factor independientemente relacionado con peor pronóstico en perros con tumores mamarios (Hellmen *et al.*, 1993; Peña *et al.*, 1998; Nieto *et al.*, 2000).

1.8.2. Índice de masa corporal

Diversos estudios señalan que un elevado índice de masa corporal se asocia con un mayor riesgo de padecer CI mamario (Chang *et al.*, 1998b), con un menor TLE y menor ST (Chang *et al.*, 2000; Dawood *et al.*, 2008a) y con una elevada incidencia de recurrencia tumoral en las vísceras (Dawood *et al.*, 2008a), comparado con pacientes con un índice de masa corporal normal o por debajo de lo normal.

Aunque existen diferencias significativas en la condición corporal que presentan las perras con CI (frecuentemente delgadas, 43%) de las que presentan otro tipo de tumor de mama no inflamatorio (generalmente obesas, 40%) (Pérez-Alenza *et al.*, 2001), probablemente esto sea debido al avanzado estado de la enfermedad de las perras con CI.

1.8.3. Diagnóstico clínico y/o patológico

Existe una gran controversia acerca de la importancia de este factor sobre el pronóstico de mujeres con CI, ya que existen diferentes estudios que avalan criterios dispares. En dichos estudios se han determinado y comparado los tiempos de supervivencia en pacientes con CI mamario que presentaron exclusivamente sintomatología clínica, sin la presencia de émbolos tumorales en los vasos linfáticos, pacientes con afectación linfática pero sin sintomatología clínica de CI y mujeres con signos tanto clínicos como patológicos. Los resultados obtenidos varían según los autores. Levine *et al.*, (1985) afirmaron que las características histológicas del CI mamario conferían un peor pronóstico, puesto que en su estudio de supervivencia observaron que los pacientes diagnosticados exclusivamente por la sintomatología, poseían una tasa de supervivencia del 60% al tercer año, mientras que

aquellos diagnosticados histopatológicamente pero que carecían de síntomas presentaron una tasa de supervivencia del 52% y los pacientes con síntomas y con evidencia patológica de un 34%. En esta misma línea, Amparo *et al.*, (2000) observaron menor supervivencia en los casos que presentaban evidencia clínica e histopatológica que en los enfermos con evidencia clínica o patológica únicamente. Sin embargo, Lucas y Perez-Mesa (1978) encontraron una supervivencia similar en los casos que presentaban evidencia clínica y patológica de CI mamario, como en los que presentaban signos clínicos solamente. Además, aquellos pacientes que sólo tenían diagnóstico histológico padecían un progreso de la enfermedad ligeramente menos agresivo. Por último, Bonnier *et al.*, (1995), observaron que no existía diferencia ni en el tiempo libre de enfermedad, ni en la supervivencia total entre las mujeres con diagnóstico histológico de CI y aquellas en las que se confirmaban ambos diagnósticos (clínico e histológico).

1.8.4. Extensión del eritema

La presencia de eritema cutáneo en el momento del diagnóstico y especialmente el tamaño del mismo, es un factor pronóstico importante en relación con la supervivencia total y el tiempo libre de enfermedad en mujeres con CI mamario. Estos tiempos de supervivencia son menores cuando el eritema ocupa la mayor parte de la superficie cutánea de la mama. Asimismo, la presencia de eritema después de la inducción quimioterápica y de la radioterapia conlleva un mal pronóstico (Chevallier *et al.*, 1987).

1.8.5. Tamaño del tumor

Debido a que la mayoría de las mujeres con CI no presentan un nódulo neoplásico definido, el tamaño del tumor no tiene el mismo valor pronóstico que en el resto de cánceres mamarios no inflamatorios (Giordano y Hortobagyi, 2003b). Sin embargo, sí se considera un factor pronóstico a tener en cuenta el tamaño tumoral cuando éste es medido después de la fase de inducción quimioterápica (Chevallier *et al.*, 1987).

1.8.6. Afectación ganglionar

El factor pronóstico más importante para las mujeres con carcinoma inflamatorio mamario es la afectación histopatológica de los ganglios linfáticos axilares. Las mujeres que presentan afectación en el ganglio axilar cursan con un peor pronóstico, menor tiempo libre de enfermedad y menor supervivencia total que aquellas mujeres cuyo ganglio

linfático no se encuentra afectado por el proceso tumoral. La metástasis al ganglio regional es sinónimo de enfermedad metastásica microscópica a nivel sistémico; la mayoría de las pacientes con CI muestran evidencia clínica de afectación ganglionar. Diferentes estudios han indicado que los nódulos linfáticos axilares y/o supraclaviculares se ven afectados en un 46 a 100% de los casos (Lee y Tannenbaum, 1924; Taylor y Meltzer, 1938; Meyer *et al.*, 1948; Rogers y Fitts, 1956; Barber *et al.*, 1961; Haagensen, 1971; Droulias *et al.*, 1976; Knight *et al.*, 1986; Chevallier *et al.*, 1987).

En el carcinoma inflamatorio mamario canino, los ganglios axilares y/o inguinales se encuentran afectados en el momento del diagnóstico en casi todos los casos (96%). Por otro lado, la totalidad (100%) de los casos con CI mamario presentan afectación ganglionar tras la necropsia del animal (Pérez-Alenza *et al.*, 2001).

1.8.7. Metástasis a distancia

Las mujeres con carcinoma inflamatorio mamario que presentan metástasis a distancia en el momento del diagnóstico, tienen una enfermedad incurable y frecuentemente experimentan una progresión tumoral rápida y una supervivencia escasa. Las mujeres con CI mamario parecen tener una mayor incidencia de enfermedad metastásica, con evidencia clínica y/o radiográfica, que otros pacientes con otro tipo de cáncer mamario no inflamatorio (Sherry *et al.*, 1985). Entre el 17% y el 36% de las mujeres con CI mamario tienen metástasis a distancia en el momento del diagnóstico (Taylor y Meltzer, 1938; Haagensen, 1971; Levine *et al.*, 1985; Singletary y Cristofanilli, 2008), en comparación con el 5% de pacientes con metástasis a distancia con cáncer mamario no inflamatorio. Durante el primer año después del diagnóstico de CI el número de pacientes que desarrollan metástasis se incrementa hasta el 67% (Schumann, 1911; Donegan, 1967; Nichini *et al.*, 1972; Barker *et al.*, 1980).

1.8.8. Receptores hormonales

Muchos estudios han hecho referencia al papel de los receptores de estrógenos y de progesterona (RE y RP) en el desarrollo y pronóstico del carcinoma inflamatorio mamario de la mujer. La mayoría de los CI mamarios son RE negativos en un porcentaje que oscila entre el 53%-100% de los casos (Delarue *et al.*, 1981; Kokal *et al.*, 1985; Paradiso *et al.*, 1989; Maloisel *et al.*, 1990) y entre un 66-84% de los CI son RP negativos (Paradiso *et al.*,

1989; Fleming *et al.*, 1997; Ueno *et al.*, 1997; Brooks *et al.*, 1998; Wilke *et al.*, 1998). Además, entre el 26-100% de los CI son negativos a ambos receptores (Hahnel y Twaddle, 1971). Generalmente, la ausencia de RE y RP ha sido relacionada con un corto periodo libre de enfermedad y con una menor supervivencia en pacientes con CI mamario (Jaiyesimi *et al.*, 1992). En las mujeres con cánceres mamarios no inflamatorios, la supervivencia a los cinco años después del diagnóstico es del 91% en aquellas con tumores RE positivos y del 77% en aquellas con tumores RE negativos. Esta influencia sobre el pronóstico es aún más evidente en los casos de carcinoma inflamatorio mamario, puesto que la supervivencia de mujeres con tumores RE positivos es del 48,5% y la de mujeres con tumores RE negativos es del 25,3% (Anderson *et al.*, 2005).

La expresión y la función del receptor de estógenos beta (RE β) en el cáncer mamario de la mujer es controvertida, encontrándose una menor o igual expresión en tumores mamarios que en tejidos mamarios benignos (Conde *et al.*, 2004), y no hay estudios acerca del papel pronóstico de este receptor en el carcinoma inflamatorio. En relación a la expresión del receptor de andrógenos (RA), existen diferentes estudios en los cuales se emplearon métodos de detección diversos. Mediante inmunohistoquímica, reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (*real time-polymerase chain reaction*, RT-PCR) y Western Blot los resultados obtenidos con respecto al porcentaje de expresión del RA, relación con el tipo histológico, malignidad, pronóstico y correlación con otros receptores eran contradictorios (Thijssen *et al.*, 1991; Blankenstein *et al.*, 1992; Selim *et al.*, 2002; Conde *et al.*, 2004). Sin embargo, en un estudio posterior donde detectaron el RA mediante inmunohistoquímica, se demostró que los RA eran frecuentemente expresados en los tumores mamarios malignos invasivos y no invasivos, y los carcinomas altamente malignos eran RE y RP negativo y RA positivo (Moinfar *et al.*, 2003).

Los receptores esteroides también se han estudiado en los tumores mamarios caninos. Al contrario de lo que ocurre en la glándula mamaria de la mujer, el epitelio de la glándula mamaria normal de la perra es positivo al receptor de estrógenos alfa (RE α) (Illera *et al.*, 2006). Los tumores mamarios caninos positivos al RE α (Nieto *et al.*, 2000) y los CI mamarios positivos a RP (Peña *et al.*, 2003a), generalmente, tienen mejor pronóstico y supervivencia. Todos los casos de CI mamario canino son negativos en la detección inmunohistoquímica del RE α y en un 71,4% positivos en la detección inmunohistoquímica del RP. La expresión de RP es más frecuente en carcinomas inflamatorios mamarios secundarios que en los primarios, y la ausencia de este receptor se

asocia a la existencia de metástasis pulmonares detectadas en el momento de la necropsia, y por tanto, posiblemente con un peor pronóstico (Peña *et al.*, 2003a). En el 93% de los casos de CI canino se expresa el RE β y, también, en el 93% de los CI caninos se ha detectado el RA, incluso las células infiltrantes altamente malignas o las células metastásicas fueron positivas al RA. Además, se ha visto una asociación entre ambos receptores, pero aún no se conoce el papel de ambos en el pronóstico de la enfermedad (Illera *et al.*, 2006).

1.8.9. Gen supresor tumoral p53

Las mutaciones en el gen supresor tumoral p53 constituyen una de las alteraciones más comunes encontradas en diversos cánceres (Nigro *et al.*, 1989). Las mutaciones del gen supresor tumoral p53 en diversos tumores malignos dan lugar a la detección inmunohistoquímica de la proteína p53, expresión que se asocia a un peor pronóstico, tanto en la mujer (Falette *et al.*, 1998; Wakui *et al.*, 2001) como en la perra (Wakui *et al.*, 2001).

Con respecto al CI mamario de la mujer, diversos estudios señalan una correlación entre la expresión de p53 y un peor pronóstico clínico y una menor supervivencia (Riou *et al.*, 1993; Gonzalez-Angulo *et al.*, 2004). Además, se ha demostrado que los carcinomas inflamatorios mamarios frecuentemente presentan un incremento de la expresión de p53 (69% casos), comparado con el resto de tumores mamarios malignos (48%) (Aziz *et al.*, 2001). Se ha propuesto que la expresión de p53 es un buen indicador de menor supervivencia, ya sea solo o en combinación con otros marcadores de pronóstico conocidos como la expresión de los receptores de estrógenos y progesterona (Riou *et al.*, 1993).

En el CI mamario canino, la elevada intensidad de expresión de p53 se asoció con un peor comportamiento clínico y patológico de éstos tumores (Peña *et al.*, 2003a).

1.8.10. Respuesta al tratamiento

La respuesta al tratamiento del CI mamario de la mujer, se valora tanto de forma clínica como patológica. Así, la extensión de los signos de carcinoma inflamatorio y el tamaño del tumor después de la inducción quimioterápica tienen un importante impacto en la supervivencia y en el tiempo libre de enfermedad (Chevallier *et al.*, 1987). Por otro lado, se ha descrito como un importante predictor del pronóstico de la enfermedad (Chevallier *et al.*, 1993b; Harris *et al.*, 2003) la respuesta histopatológica a la quimioterapia

neoadyuvante, considerando como respuesta completa histopatológica la ausencia de enfermedad tanto en la mama como en los ganglios axilares (Kuerer *et al.*, 1999).

1.8.11. Genes con valor pronóstico

Se han identificado diversos genes que podrían estar implicados en el comportamiento tan agresivo del carcinoma inflamatorio mamario de la mujer, como erbB-2, MIB1, MUC-1 y E-cadherina, aunque el valor pronóstico de dichos genes es controvertido (Guerin *et al.*, 1989; Prost *et al.*, 1994; Charafe-Jauffret *et al.*, 2004). Por otro lado, se han descrito 3 genes MYCN, SHH y EREG, cuyo perfil de expresión está relacionado con malo, intermedio y buen pronóstico respectivamente (Bieche *et al.*, 2004).

1.9. Tratamiento del carcinoma inflamatorio

1.9.1. Carcinoma inflamatorio humano

Los primeros estudios clínicos sobre el CI en la mujer indicaban que los pacientes con carcinoma inflamatorio mamario tratados exclusivamente con cirugía mostraban unos pobres resultados. De forma similar ocurría con la terapia local con radiación o con una combinación de radiación y cirugía, que no daba lugar a unos tiempos de supervivencia largos (Jaiyesimi *et al.*, 1992). Con estas terapias, el CI mamario se consideraba una enfermedad fatal, con una supervivencia de las mujeres afectadas menor del 5% a los 5 años del diagnóstico y con un tiempo medio de supervivencia de 2,4 a 15 meses (Lee y Tannenbaum, 1924; Bozzetti *et al.*, 1981).

El pronóstico del CI mamario no mejoró hasta que en la década de los 70 se instauró un régimen de quimioterapia secuencial combinada (Blumenschein *et al.*, 1976). El empleo de quimioterapia primaria sistémica combinada con cirugía y radiación es lo que se conoce como terapia multimodal. Esta terapia ha revolucionado el tratamiento de esta enfermedad y ha mejorado el tiempo libre de enfermedad y de supervivencia total de las mujeres afectadas, con respecto a lo descrito previamente (Blumenschein *et al.*, 1976; Jaiyesimi *et al.*, 1992; Ueno *et al.*, 1997; Harris *et al.*, 2003; Low *et al.*, 2004; Bauer *et al.*, 2005; Veyret *et al.*, 2006). El tratamiento óptimo del CI mamario requiere una cuidadosa coordinación entre los oncólogos médicos, radioterapeutas y cirujanos, porque la mayor parte de los pacientes son tratados con una combinación de estas modalidades terapéuticas (Giordano, 2003a) (**Figura 3**).

El componente inicial de la terapia consiste en la fase de inducción quimioterápica. Debido a la heterogeneidad del CI mamario, es complicado designar un protocolo quimioterápico que sea capaz de controlar la enfermedad en todos los pacientes; sin embargo, las antraciclinas (como la doxorubicina) se usan como fármaco base por su elevada efectividad, sola o en combinación con ciclofosfamida y/o taxanos (Ueno *et al.*, 1997; Giordano y Hortobagyi, 2003b). Con respecto a las dosis más adecuadas en estos casos existe controversia, ya que algunos autores afirman que el uso de elevadas dosis está asociado a una mayor supervivencia (Panades *et al.*, 2005), mientras que otros autores han observado que los resultados no son mejores con una intensificación de la dosis (Chevallier *et al.*, 1993a; Therasse *et al.*, 2003). Tras la administración de la quimioterapia, se debe evaluar la respuesta tanto clínica como histopatológicamente. La evaluación de la respuesta histopatológica es de gran importancia por su significado pronóstico. Aquellos pacientes que muestran una respuesta patológica completa, presentan mayor supervivencia y tiempo libre de enfermedad que aquellos que tienen evidencia de enfermedad residual tras la inducción con quimioterapia (Kuerer *et al.*, 1999; Hennessy *et al.*, 2006).

Después de la inducción de quimioterapia, los pacientes deben someterse a una terapia local definitiva con radiación, cirugía o ambos. Aún existe controversia acerca del tratamiento local más adecuado. Esta enfermedad tradicionalmente se ha considerado inoperable, debido a su mal pronóstico, sin embargo, la supervivencia ha mejorado debido al papel de la quimioterapia, por lo que la eficacia de la cirugía se ha vuelto a evaluar (Giordano y Hortobagyi, 2003b). Algunos estudios avalan que la mastectomía podría mejorar el tiempo libre de enfermedad y la supervivencia en pacientes con respuesta parcial o completa a la quimioterapia neoadyuvante (Fleming *et al.*, 1997; Curcio *et al.*, 1999), aunque otros autores sugieren que la cirugía no ofrece ninguna mejora de la supervivencia (Mourali *et al.*, 1993; De Boer *et al.*, 2000). Con respecto a la radioterapia, es el tratamiento local de elección en aquellos casos que continúan siendo inoperables después de la quimioterapia de inducción, o que no son buenos candidatos para la cirugía (Brooks *et al.*, 1998). Incluso después de la quimioterapia de inducción y el tratamiento local, la proporción de casos que recidivan es elevada, por ello, después de la terapia local en los pacientes se debe instaurar un protocolo de quimioterapia adyuvante con antraciclina o taxanos, seguido de una radioterapia adyuvante, cuando no haya sido administrada previamente, para evitar recidivas de la enfermedad (Giordano y Hortobagyi, 2003b). Se ha descrito que la terapia endocrina no mejora de forma significativa la supervivencia de

las mujeres con CI mamario (Lopez y Porter, 1996), probablemente debido a que la mayor parte de los CI son receptor de estrógeno y de progesterona negativos. Sin embargo, aquellos pacientes cuyos tumores tengan receptores hormonales, deben ser tratados durante 5 años con terapia hormonal adyuvante con tamoxifeno o inhibidores de la aromatasa (por ej. anastrozol), para minimizar el riesgo de recurrencia (Giordano y Hortobagyi, 2003b).

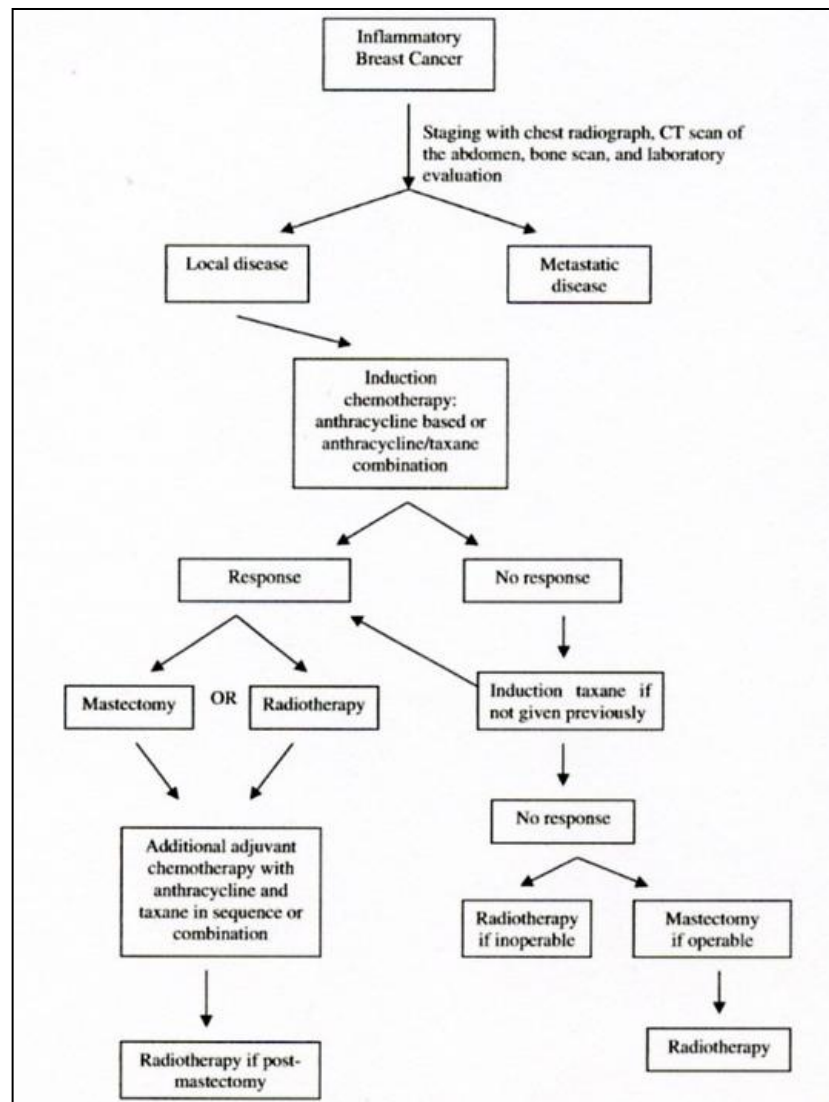


Figura 3. Esquema resumen del tratamiento del cáncer inflamatorio mamario de la mujer. Imagen tomada de Giordano y Hortobagyi, 2003b.

A pesar de los avances realizados en el tratamiento de esta enfermedad y del empleo de terapias multimodales, sólo un tercio de las mujeres afectadas se curan (Giordano, 2003a). El siguiente paso en el tratamiento, es la introducción de terapias biológicas novedosas que combinadas con la quimioterapia puedan incrementar su eficacia. Entre los numerosos marcadores moleculares del CI mamario, destacan sobre

todo familia de receptores HER-1 (receptor de erB1) y HER-2 (receptor de erB2), de los factores angiogénicos como el factor de crecimiento del endotelio vascular (*vascular endothelial growth factor*, VEGF), de la E-cadherina y de RhoC (Dawood *et al.*, 2008b). De hecho, se han probado diferentes fármacos, uno de ellos es el trastuzumab, que es un anticuerpo contra la proteína HER-2, que ha dado lugar a una respuesta histopatológica en el 60% de los casos de CI mamarios operables cuando se combina con quimioterapia (Dawood *et al.*, 2007). También se ha empleado en mujeres con CI mamario pretratadas el Lapatinib, inhibidor reversible de las tirosina-kinasas ErB1/ErB2, obteniendo respuestas parciales (Burris *et al.*, 2005; Spector *et al.*, 2006). Por otro lado, se han probado varios inhibidores de angiogénesis como el bevacizumab, el SU5416 y el ZD6474, aunque los resultados en los pacientes con CI mamario aún son limitados (Dawood *et al.*, 2008b). Otra alternativa terapéutica en mujeres con CI mamario ha sido el uso de dosis altas de quimioterapia combinada con un trasplante autólogo de médula ósea, obteniéndose resultados prometedores en cuanto al tipo de respuesta y supervivencia total (Viens *et al.*, 1999; Cheng *et al.*, 2004; Somlo *et al.*, 2004), sin embargo, el uso de dosis de quimioterapia muy elevadas en casos de CI mamario aún es controvertido y por el momento es una terapia experimental (Dawood *et al.*, 2008b).

Aunque la terapia multimodal ha conseguido lograr una mejora significativa de la supervivencia total y del control local del CI mamario, aún existe una elevada tasa de casos que recidivan y una gran parte de las mujeres afectadas sucumbe a esta enfermedad. Ya se conocen diversos posibles marcadores moleculares del CI mamario, sin embargo, aún no se ha definido bien su papel en el pronóstico. Es necesario determinar qué marcadores biológicos son específicos del CI mamario para desarrollar nuevas estrategias terapéuticas (Giordano, 2003a; Dawood *et al.*, 2008b). Por ejemplo, RhoC, ErB2, VEGFA, E-cadherina y angiopoyetina podrían ser un potencial objetivo para la terapia de CI mamario (Shirakawa *et al.*, 2002; Dawood *et al.*, 2008b). Por otro lado, una definición precisa de las características genéticas del CI mamario, ayudaría a distinguirlo de otras formas de tumor mamario localmente avanzado y a individualizar el diagnóstico y el programa terapéutico (Dawood *et al.*, 2008b).

1.9.2. Carcinoma inflamatorio canino

En la especie canina, a diferencia de la mujer, no se utiliza terapia multimodal para el tratamiento del carcinoma inflamatorio. En muchos casos, el CI mamario se presenta en un estadio muy avanzado y se procede a la eutanasia humanitaria del animal sin establecer tratamiento. En el caso de establecer una terapia, se administran antibióticos y antiinflamatorios (como glucocorticoides, por ejemplo prednisona a dosis 0,5-1,5 mg/kg de peso/día) como tratamiento paliativo hasta el momento de la eutanasia (Pérez-Alenza *et al.*, 2001).

Aunque no existe un protocolo de quimioterapia específico para el carcinoma inflamatorio mamario canino, nuestro grupo de investigación ha administrado, en diversos casos de CI mamario, un tratamiento quimioterápico. Dicho tratamiento se basa en la administración de mitoxantrona sola o en combinación con vincristina y ciclofosfamida, además de una terapia paliativa con antibióticos de amplio espectro y antiinflamatorios. En un estudio retrospectivo se ha comprobado que los animales tratados con este protocolo de quimioterapia presentaban un mayor tiempo de supervivencia (57 días) que aquellos animales a los que sólo se les administró tratamiento paliativo (35 días). Sin embargo, aunque la quimioterapia aumenta la supervivencia de los animales con CI, ésta es muy inferior a la observada en animales con tumores mamarios malignos no CI (Clemente *et al.*, 2009).

1.10. Hallazgos de autopsia y necropsia del cáncer mamario de la mujer y la perra

El cáncer mamario de la mujer puede metastatizar a distancia a diversos órganos, siendo casi imposible predecir el órgano o sistema que va a ser invadido (Lee, 1983). No existen datos publicados acerca de las alteraciones observadas en la autopsia realizada a pacientes con carcinoma inflamatorio mamario. Desde el año 1950 se han realizado diversos estudios de autopsia en mujeres con tumores mamarios no CI, en los que se describe el patrón de metástasis que se produce generalmente en las mujeres que padecen este tipo de neoplasias (**Figura 4**) (Abrams *et al.*, 1950; Meissner y Warren, 1971; Sproul cited by Haagensen, 1971; Viadana *et al.*, 1973 Cifuentes y Pickren, 1979; Cho y Choi, 1980; Hagemeister *et al.*, 1980; Amer, 1982; Parham y Robertson, 1989; Mochizuki *et al.*, 1997). A pesar de que los datos publicados proceden de diferentes instituciones, los hallazgos de los órganos afectados por metástasis son muy similares (Lee, 1983). Es

importante conocer el patrón de metástasis del cáncer mamario, puesto que en muchas ocasiones no es el tumor primario sino las metástasis a distancia la principal causa de muerte (Weigelt *et al.*, 2005). Generalmente los pacientes con cáncer de mama desarrollan metástasis en múltiples sitios (Barista *et al.*, 1996), pero los principales lugares donde se producen metástasis son los pulmones (74-82%), hueso (49-74%), ganglios (50-90%), hígado (50-80%) y pleura (45-75%), seguidos en un menor porcentaje de casos por otras vísceras como las glándulas adrenales (30-54%), cerebro (10-36%), tracto gastrointestinal (14-30%), peritoneo (13-33%), bazo (11-26%), ovarios y páncreas (11-38%), riñones (11-27%), pericardio (19-35%) y corazón (5-13%) (Abrams *et al.*, 1950; Meissner y Warren, 1971; Sproul cited by Haagensen, 1971; Viadana *et al.*, 1973; Cifuentes y Pickren, 1979; Cho y Choi, 1980; Hagemeister *et al.*, 1980; Amer, 1982; Parham y Robertson, 1989; Mochizuki *et al.*, 1997).

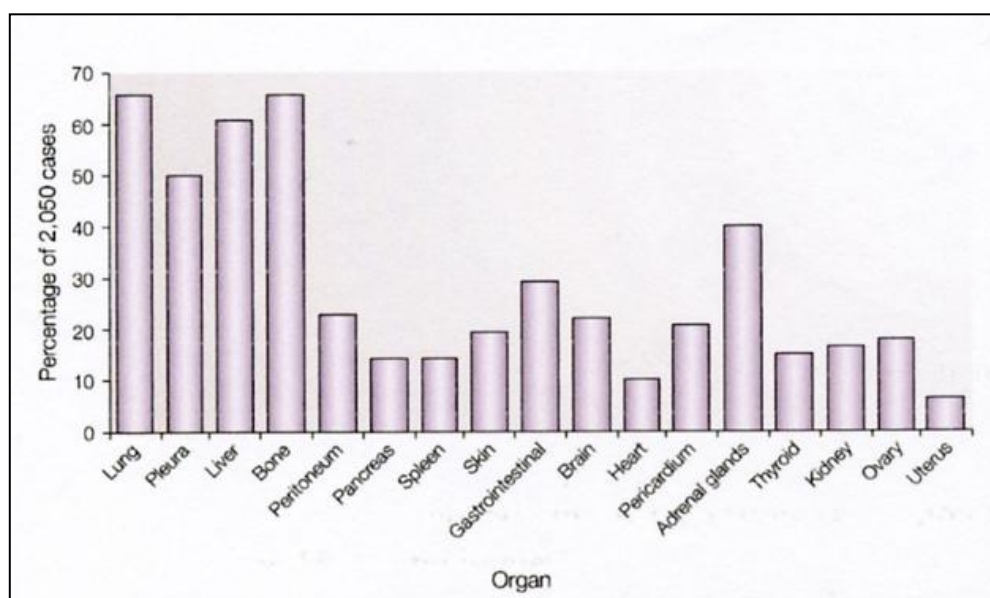


Figura 4. Lugares más comunes de metástasis de los tumores mamarios de la mujer. Imagen tomada de Weigelt *et al.*, 2005.

Por tanto, los cinco órganos que más frecuentemente están afectados con metástasis en el momento de la autopsia son el pulmón, hueso, ganglios, hígado y pleura. En el momento de la autopsia, al rededor del 85% de los pacientes tienen afectación de hueso, pulmón o hígado. Se ha descrito que mientras el hueso, el pulmón y el hígado están libres de metástasis, la posibilidad de presentar metástasis a distancia del tumor primario es menor del 3%. Sin embargo, la frecuencia de metástasis se incrementa cuando uno de estos lugares mencionados es invadido por el carcinoma primario (Lee, 1983).

Los pacientes menores de 50 años presentan una incidencia más elevada de metástasis generalizada que los pacientes de mayor edad y un número significativamente mayor de metástasis en hueso, hígado, cerebro y glándula tiroides o adrenales (Lee, 1983).

En la especie canina, los tumores mamarios suelen metastatizar en primer lugar a los ganglios regionales. Los tumores mamarios localizados en las tres primeras glándulas mamarias, incluso en la cuarta, metastatizan al ganglio axilar ipsilateral y los situados en las mamas tercera, cuarta y/o quinta, metastatizan al ganglio inguinal (Dobson y Lascelles, 2003). Además de estos ganglios regionales, los sitios más comunes de metástasis son los pulmones, los ganglios mediastínicos y esternales, ganglios sublumbar y preescapulares y el hígado (Withrow y Vail, 2007). Otros lugares menos frecuentes son el hueso (Cooley y Waters, 1998), las glándulas adrenales (Labelle y De Cock, 2005) y el corazón (Grieco *et al.*, 2008).

Por otro lado, se han descrito los hallazgos macroscópicos más importantes observados en las necropsias de perras con CI (Pérez-Alenza *et al.*, 2001). A parte de la afectación cutánea y de la intensa infiltración de los tejidos adiposo y muscular de la región y marcado edema subcutáneo (Pérez-Alenza *et al.*, 2001) se ha descrito que el 100% de los casos presentaban metástasis en los ganglios regionales (Susaneck *et al.*, 1983; Pérez-Alenza *et al.*, 2001). Además, los órganos afectados con metástasis difieren de los afectados habitualmente en otros tumores mamarios malignos, ya que se encuentran nódulos metastásicos en localizaciones no usuales como la vejiga de la orina (1,5%), y el útero (10%) (Pérez-Alenza *et al.*, 2001), además de aparecer en pulmón (62% Pérez-Alenza *et al.*, 2001; 70 % Susaneck *et al.*, 1983) y corazón (10%) (Pérez-Alenza *et al.*, 2001).

2. MODELOS EXPERIMENTALES DE CANCER INFLAMATORIO

2.1. *In vitro*

Se han establecido dos líneas celulares que derivan de CI humanos denominados SUM-149 y SUM-190 que pueden ser usadas para inducir carcinomas inflamatorios mamarios en ratones inmunodeficientes. Estas líneas celulares han sido caracterizadas mediante las técnicas de hibridación genómica comparativa y *diferencial display* con respecto a la expresión de diversos receptores hormonales, de p53 y con respecto a

diversas características citogenéticas (Forozan *et al.*, 1999). Asimismo, en algunos estudios a partir de la línea SUM-149, se ha detectado el incremento de la expresión del gen RhoC (van Golen *et al.*, 2000a).

2.2. *In vivo*

Alpaugh *et al.*, desarrollaron, en el año 1999, un modelo experimental de CI humano en el ratón mediante el trasplante de células tumorales en ratones inmunodeprimidos (SCID) denominado MARY-X. Además, otros autores han desarrollado un xenotransplante de CI humano denominado WIBC-9 empleando ratones SCID y ratones normales (BALB/c) (Shirakawa *et al.*, 2001). Se ha comprobado que los ratones inmunodeficientes xenotransplantados MARY-X han desarrollado tumores dentro de los vasos sanguíneos y linfáticos y eritema de la piel que recubre la mama, al igual que sucede en los pacientes con CI. De la misma forma que los CI mamarios de la mujer, los tumores de los ratones MARY-X son RE negativo, RP negativo, p53 positivo y receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGFR) positivo, aunque son HER-2/neu negativo. El modelo de ratón xenotransplantado MARY-X se ha utilizado para el estudio de diversas moléculas y sus receptores como integrinas, inmunoglobulinas, factores de crecimiento vascular endotelial, factores de crecimiento fibroblástico, factores de crecimiento transformante y proteasas (Alpaugh *et al.*, 1999). Estudiando de manera comparativa el modelo de ratón xenotransplantado MARY-X con los ratones xenotransplantados con tumores mamarios no CI (MDA-MB-231 y MDA-MB-468), dichos autores observaron que sólo había dos moléculas cuya expresión se encontraba incrementada en los tumores del modelo MARY-X (CI) con respecto al de los modelos MDA-MB-231 y MDA-MB-468 (no CI), que eran la E-cadherina y la mucina-1 (MUC-1). Por otro lado, demostraron que sólo la negatividad a los RE y RP, la positividad a p53 y al EGFR no podían ser la causa del fenotipo inflamatorio, porque estos marcadores se expresaban tanto en los ratones xenotransplantados de cáncer inflamatorio como en los de no cáncer inflamatorio (Alpaugh *et al.*, 1999).

Con respecto al modelo WIBC-9, éste preserva las características biológicas e histológicas del CI mamario humano y, por tanto, en los ratones WIBC-9 se observan eritema de la piel que recubre la mama, marcada invasión de émbolos linfáticos y una tasa elevada de metástasis (**Figura 5**).



Figura 5. Modelo de ratón xenotransplantado WIBC-9. Apariencia característica del lugar de inoculación subcutánea del tumor. Ratón de 7 semanas fotografiado 2 semanas después de la inoculación, exhibiendo eritema. Imagen obtenida de Shirakawa *et al.*, 2001.

La línea celular que se obtiene de WIBC-9 es aneuploide y presenta una amplificación del gen *erbB-2*, una pérdida de receptores hormonales y un incremento de la expresión de los genes de la interleukina-8 (IL-8), del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) y de su receptor (*vascular endothelial growth factor receptor-1*, VEGFR-1 o Flt-1), del factor de crecimiento epidérmico (*epidermal growth factor*, EGF), del factor del crecimiento fibroblástico-b (*fibroblastic growth factor-b*, bFGF), de la angiopoyetina 13 y de los receptores tirosina-kinasa Tie-1 y Tie-2, a diferencia de lo encontrado en los modelos xenotransplantados no inflamatorios (Shirakawa *et al.*, 2001). Por otra parte, en este modelo murino se ha detectado una elevada expresión del antígeno HER-2/neu y una característica histológica única: en la parte central de los nidos tumorales, se ha observado un fenómeno conocido como *vasculogenic mimicry* (mimetismo vascular, MV) (Kobayashi *et al.*, 2002; Shirakawa *et al.*, 2002d), que consiste en la formación de canales vasculares a partir de células tumorales altamente malignas, sin la presencia de células endoteliales (Maniotis *et al.*, 1999).

Como ya se ha comentado anteriormente, las especies canina y felina son las únicas especies animales en las que se ha descrito la aparición espontánea de CI. Esta enfermedad fue descrita por primera vez en el perro por Susaneck, *et al.*, en el año 1983 y en el gato por Pérez-Alenza, *et al.*, en el año 2004. El CI en la especie canina presenta características epidemiológicas, clínicas y patológicas similares a las de la especie humana (Susaneck *et al.*, 1983; Pérez-Alenza *et al.*, 2001). En la especie felina, el CI mamario tiene una prevalencia reducida (inferior a la del CI mamario canino) y sólo se han descrito CI mamarios secundarios (post-quirúrgicos) (Perez-Alenza *et al.*, 2004).

En general, los tumores mamarios espontáneos caninos y felinos pueden ser empleados como modelo de cáncer mamario humano (Vail y MacEwen, 2000). Teniendo en cuenta las características histológicas y la evolución clínica, los tumores mamarios felinos constituyen un modelo comparativo para las neoplasias mamarias de la mujer más adecuado que los tumores mamarios caninos. Sin embargo, por las características del CI mamario felino (baja prevalencia, CI secundario y RE positivo), probablemente es más apropiado el CI canino como modelo de estudio del CI mamario humano (Perez-Alenza *et al.*, 2004).

3. VASCULARIZACIÓN EN EL CARCINOMA INFLAMATORIO MAMARIO

El carcinoma inflamatorio en la mujer se caracteriza por ser un tumor altamente angiogénico, linfangiogénico y angioinvasivo (Van der Auwera *et al.*, 2004). A continuación, se detalla la importancia de los procesos de angiogénesis y linfangiogénesis en las neoplasias de la especie humana y canina, prestando especial atención al CI mamario.

3.1. Angiogénesis tumoral

En los individuos adultos, el proceso de formación de vasos sanguíneos se conoce como angiogénesis o neovascularización (Kumar *et al.*, 2005). Hasta hace pocos años, se pensaba que la vascularización de los tumores malignos se producía exclusivamente mediante brotes vasculares a partir de vasos pre-existentes. Sin embargo, recientemente se han hecho avances que han identificado más procesos de angiogénesis y remodelación vascular (Dome *et al.*, 2007). Existen varios procesos mediante los cuales se produce el fenómeno de vascularización tumoral, que se resumen a continuación (**Figura 6**).

Generalmente, se asume que las células tumorales requieren un aporte sanguíneo para su crecimiento y para la producción de metástasis (Folkman, 1995b). Los tumores pueden aumentar su tamaño aproximadamente 1-2 milímetros sin que sus demandas metabólicas sean restringidas. Sin embargo, debido a la limitada difusión de oxígeno y nutrientes, para crecer por encima de ese tamaño el tumor debe cambiar a un fenotipo angiogénico. Este proceso es regulado por factores pro- y anti-angiogénicos (Carmeliet y Jain, 2000).

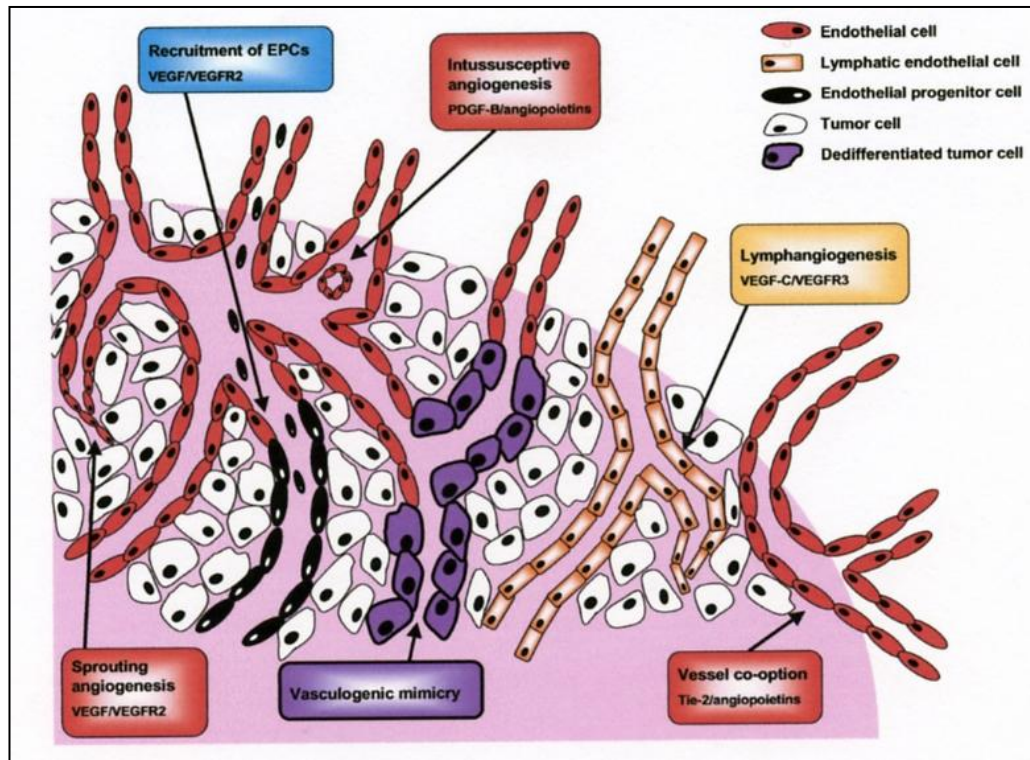


Figura 6. Esquema resumen de los 6 mecanismos diferentes de vascularización tumoral. Imagen tomada de (Hillen and Griffioen, 2007).

3.1.1. Angiogénesis a partir de vasos preexistentes

Este mecanismo consiste en la formación de nuevos capilares a partir de la ramificación y extensión de los vasos sanguíneos adyacentes. Este proceso tiene lugar de forma fisiológica en determinadas situaciones, como durante el desarrollo embriogénico o el proceso de cicatrización, pero también representa un papel importante en numerosas patologías como en el cáncer (Carmeliet, 2005; Kumar *et al.*, 2005). En las neoplasias, la formación de vasos a partir de vasos preexistentes es importante, tanto en los tumores primarios como en la formación y crecimiento de las metástasis (Folkman, 1995b; Hanahan y Weinberg, 2000).

Existen dos mecanismos por los que se producen nuevos vasos a partir de los existentes:

- Angiogénesis por brotes vasculares: Este mecanismo de angiogénesis tumoral comienza con la activación de las células endoteliales por parte de factores de crecimiento específicos que se unen a su receptor. Posteriormente, la matriz extracelular y la membrana basal que rodea a las células endoteliales son degradadas localmente por proteasas. Esto permite que las células endoteliales invadan la matriz y proliferen y migren a través de ella. Las células endoteliales

que migran forman una luz por polarización y dan lugar a un vaso inmaduro (Ferrara *et al.*, 2003), que se reestabilizará gracias al reclutamiento de células murales y a la generación de matriz extracelular (Jain, 2003) (**Figura 7**).

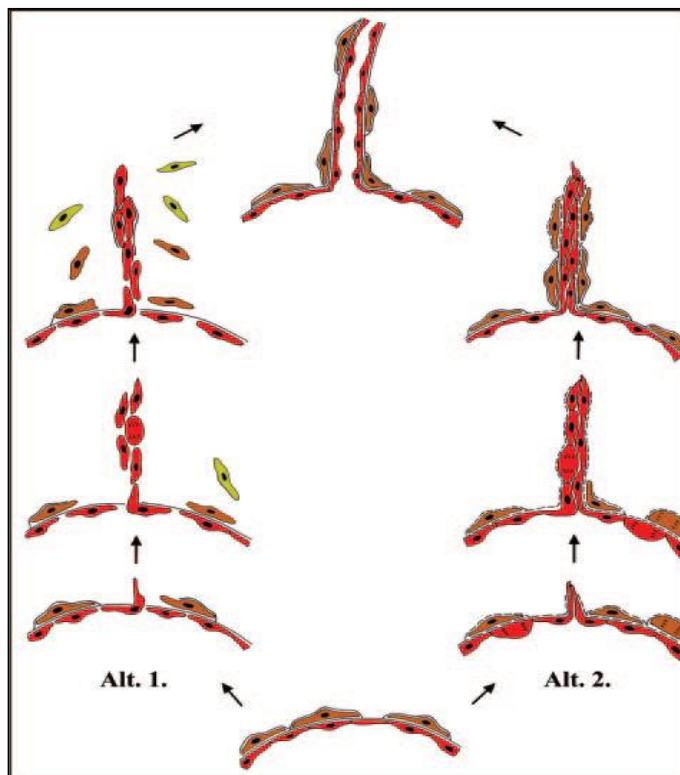


Figura 7. Brotes vasculares. Las células rojas representan las células endoteliales, las marrones representan los pericitos y las amarillas las células murales o de otro origen (fibroblastos, células osteogénicas o derivados de médula ósea). Imagen tomada de Döme, *et al.*, 2007.

- b) Angiogénesis por intususcepción: Este mecanismo consiste en la división de los vasos preexistentes en dos nuevos vasos, mediante la formación de un pilar tisular transvascular en el interior de la luz del vaso. Posteriormente, se produce el crecimiento de dicho pilar, dando lugar a la división de la luz del vaso. Este proceso se produce de forma muy rápida, en horas o incluso en minutos, debido a que no es necesaria la proliferación de células endoteliales, la degradación de membrana basal ni la invasión de tejido conectivo (Burri *et al.*, 2004). La regulación molecular de este mecanismo es poco conocida, puesto que se describió hace escasos años. En los tumores malignos, tras la formación de redes de capilares inmaduros formados por brotes a partir de vasos pre-existentes, el crecimiento vascular adicional de éstos, el desarrollo de redes complejas e incluso la remodelación de las mismas, se podrían realizar por este mecanismo (Dome *et al.*, 2007) (**Figura 8**).

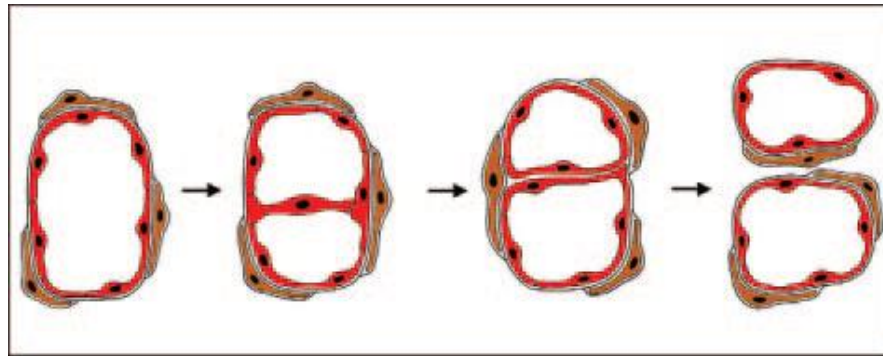


Figura 8. Representación esquemática del crecimiento vascular por intususcepción. Las células rojas son las células endoteliales, las marrones los pericitos y en gris se representa la membrana basal. Imagen tomada de Döme, *et al.*, 2007.

En tumores mamarios de ratones transgénicos, se ha comprobado que los tumores de pequeño tamaño exhiben gran cantidad de brotes vasculares, mientras que los tumores grandes presentan abundantes pilares transversales. Frecuentemente se pueden apreciar estas dos formas de angiogénesis en el mismo nódulo (Djonov *et al.*, 2001).

3.1.2. Angiogénesis a partir de células precursoras de células endoteliales

Hasta el año 1997 se consideraba que en los individuos adultos la formación de nuevos vasos se producía exclusivamente a partir de vasos preexistentes (Asahara *et al.*, 1997). Sin embargo, se ha establecido que la formación de nuevos vasos en el organismo adulto se puede iniciar a partir de células precursoras de endoteliales (CPE) (angioblastos), almacenadas en la médula ósea (Reyes *et al.*, 2002) y reclutadas hacia los tejidos (Kumar *et al.*, 2005) (**Figura 9**).

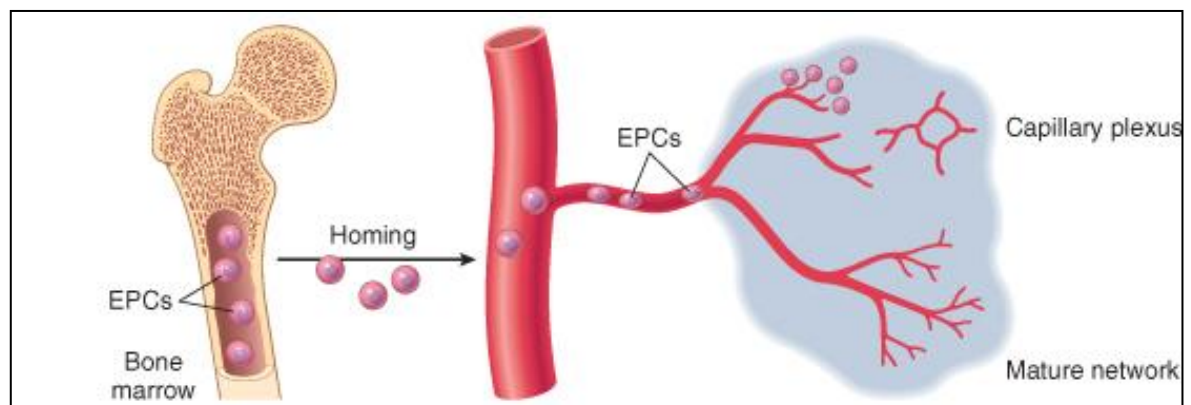


Figura 9. Angiogénesis por movilización de células precursoras endoteliales (CEP) (*endotelial precursor cells*, EPCs) a partir de la médula ósea. Imagen obtenida de Kumar *et al.*, 2005.

Estas CPE expresan marcadores de células madre hematopoyéticas (Conway *et al.*, 2001) así como marcadores específicos endoteliales como CD34, CD31, receptor del factor de crecimiento del endotelio vascular-2 (VEGFR-2) y Tie-2 (Asahara *et al.*, 1997; Hill *et al.*, 2003). Se ha descrito que la CPE participan en la neovascularización de los tumores (Hill *et al.*, 2003) y que su movilización y reclutamiento es promovida por diversos factores de crecimiento, citocinas y quimiocinas, que se producen tanto en procesos fisiológicos como durante el crecimiento tumoral (Heissig *et al.*, 2002). La diferenciación de CPE a células endoteliales maduras es principalmente mediada por el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) (Asahara *et al.*, 1997; Gehling *et al.*, 2000).

Aunque la participación de las CPE en los procesos de vascularización es obvia, existe controversia acerca de la contribución de las CPE al crecimiento de los vasos en los procesos tumorales (Dome *et al.*, 2007). Algunos autores afirman que las CPE representan un papel principal en la angiogénesis tumoral (Rajantie *et al.*, 2004; Peters *et al.*, 2005), mientras otros afirman que su contribución en la vascularización de las neoplasias es mínima (Machein *et al.*, 2003; Gothert *et al.*, 2004).

3.1.3. Angiogénesis por co-opción vascular

Generalmente se acepta que el crecimiento de los tumores y de las metástasis comienza como una masa avascular y, posteriormente, se desarrollan nuevos vasos para poder continuar el crecimiento. Sin embargo, se ha sugerido que muchos tumores pueden crecer en un estadio avascular, principalmente en tejidos bien vascularizados como el cerebro o el pulmón (Wesseling *et al.*, 1994; Holmgren *et al.*, 1995; Pezzella *et al.*, 1997). Según esta teoría, las células tumorales podrían crecer asociadas a microvasos pre-existentes.

El primer estudio que describió la existencia co-opción vascular se publicó en el año 1999 (Holash *et al.*, 1999) e indicaba que la co-opción se podía producir en fases iniciales del crecimiento tumoral; sin embargo, posteriormente se ha observado que ésta se puede producir durante todo el periodo de crecimiento tumoral (Dome *et al.*, 2002). Este proceso da lugar al desarrollo de largos y tortuosos vasos sin membrana basal dentro de un nódulo tumoral. El mantenimiento de estos vasos depende de la supervivencia de las células endoteliales, gracias al microambiente tumoral. Los factores más importantes en el control de este proceso son las angiopoyetinas y el VEGF (Holash *et al.*, 1999).

3.1.4. Mimetismo vascular

Como ya se ha mencionado, los tumores requieren un aporte de sangre para su crecimiento y además, la microcirculación tumoral juega un papel fundamental en la diseminación hematológica del cáncer (Folkman, 1995b). Los mecanismos de vascularización tumoral descritos previamente han sido objeto de estudio durante mucho tiempo. Sin embargo, en el año 1999 se describió un proceso novedoso por el cual los tumores desarrollan un patrón de microcirculación independiente del fenómeno de angiogénesis y de los procesos de vascularización conocidos hasta ese momento, mecanismo que se denominó mimetismo vascular (“*vasculogenic mimicry*”) (Maniotis *et al.*, 1999).

El mimetismo vascular (MV) consiste en la generación “de novo” de canales microvasculares formados por células tumorales altamente agresivas e invasivas, genéticamente desreguladas, sin la participación de las células endoteliales e independientemente del proceso de angiogénesis (Folberg *et al.*, 2000). Se denominó con este término haciendo referencia a dos características fundamentales de este proceso:

- **Mimetismo:** los canales no son vasos sanguíneos pero asemejan la función de los mismos.
- **Vascular:** describe que la formación de los canales vasculares no se produce a partir de vasos pre-existentes, a pesar de que estos nuevos canales distribuyen plasma y pueden contener células de la sangre.

Por tanto el MV provee a los tumores de una ruta de perfusión independiente de la angiogénesis (Folberg y Maniotis, 2004).

Este novedoso fenómeno de vascularización tumoral fue descrito por primera vez en el melanoma humano (Maniotis *et al.*, 1999). A partir de secciones de tejido de melanoma uveal agresivo y de melanoma cutáneo metastásico, se observó que no existían zonas de necrosis y que se apreciaba un patrón de bucles de matriz extracelular que estaban interconectados. Para detectar estos canales vasculares asociados a matriz, se realizaron técnicas de angiografía y se tiñeron secciones tisulares con ácido periódico de Schiff (PAS), observando que existía positividad en estos canales. Además, histológicamente también detectaron células de la sangre dentro de estos canales PAS-positivos (PAS+) (Figura 10).

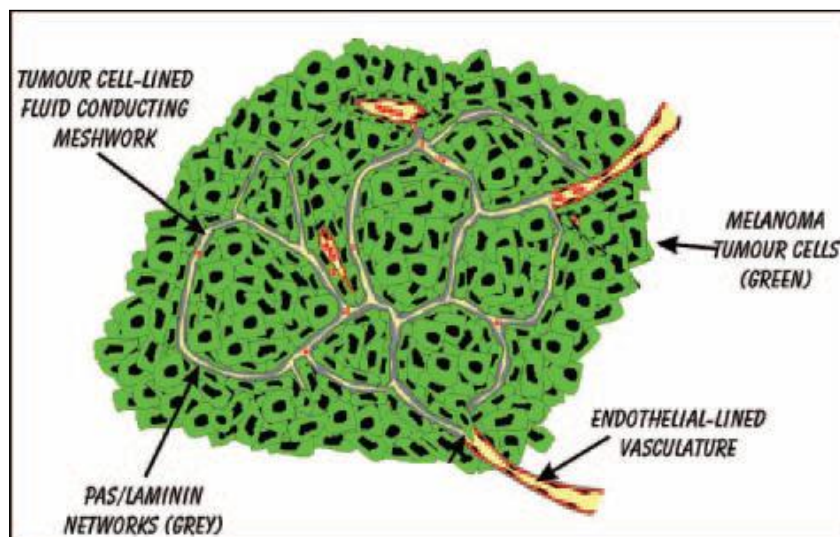


Figura 10. Representación del mimetismo vascular. Imagen tomada de Döme *et al.*, 2007.

Se estableció que la presencia histológica de estos bucles estaba significativamente asociada con la muerte de los pacientes por melanoma metastásico y que existía una gran diferencia en cuanto a supervivencia entre los pacientes que presentan los canales y los que no (Maniotis *et al.*, 1999). Por otro lado, no se identificaron células endoteliales que estuvieran formando parte de esos canales mediante observación microscópica con hematoxilina-eosina (H-E), ni mediante microscopía de transmisión, ni tampoco realizando técnicas inmunohistoquímicas que incluían marcadores de células endoteliales (Factor von Willebrand (*von Willebrand Factor*, vWF), CD31, CD34, Ulex y VEGFR-2 (KDR/Flk-1)). Lo que se observó microscópicamente fue una estructura vascular carente de células endoteliales, formada por una fina lámina basal (PAS+) y por células tumorales que contenían premelanosomas y melanosomas. Además, mediante técnicas inmunohistoquímicas se comprobó que las células tumorales que formaban esos canales no se teñían con marcadores de células endoteliales, sólo algunas de ellas eran positivas ligeramente al marcador CD31 (Maniotis *et al.*, 1999).

Asimismo, estos autores realizaron pruebas *in vitro*, utilizando cultivos celulares tridimensionales que contenían Matrigel o Colágeno tipo I con células de melanoma coroidal, melanocitos normales y con células de metástasis de melanoma intraocular. Estos cultivos carecían de células endoteliales y fibroblastos. Sin embargo, al añadir factores de crecimiento como el factor de crecimiento fibroblástico (bFGF), el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) se observó que las células tumorales altamente

malignas generaban patrones de canales (mimetismo vascular) *in vitro*. Por el contrario, ni los melanocitos ni las células de melanoma poco invasivas eran capaces de generar dicho patrón de canales bajo las mismas condiciones de cultivo mencionadas (Maniotis *et al.*, 1999). Por último, se realizó un análisis *microarray* de ADNc con células tumorales de melanoma altamente malignas y con células poco invasivas y se confirmó que existía una reversión genética de las células más malignas hacia un genotipo altamente indiferenciado, parecido al embrionario (Maniotis *et al.*, 1999).

En consecuencia a todo lo anterior, el fenómeno de MV se consideró como un posible mecanismo responsable del crecimiento tumoral y del proceso de metástasis (Maniotis *et al.*, 1999).

Posteriormente a este primer estudio en melanoma intraocular, se realizaron investigaciones similares con muestras de tejido humano, descubriéndose que este tipo de vascularización tumoral se encuentra presente en otros tipos tumorales como en el melanoma cutáneo (Thies *et al.*, 2001; Warso *et al.*, 2001), melanoma oral (Lee *et al.*, 2002), ***carcinoma inflamatorio mamario*** (Shirakawa *et al.*, 2001; Kobayashi *et al.*, 2002; Shirakawa *et al.*, 2002a; Shirakawa *et al.*, 2002b; Shirakawa *et al.*, 2002d; Shirakawa *et al.*, 2003), carcinoma mamario ductal (Buijs *et al.*, 2004), carcinoma prostático (Liu *et al.*, 2002; Sharma *et al.*, 2002), carcinoma ovárico (Sood *et al.*, 2001), rabdomiosarcoma (Hao *et al.*, 2003), sinoviosarcoma (Hao *et al.*, 2002), sarcoma mesotelial (Sun *et al.*, 2004), carcinoma hepatocelular (Guzman *et al.*, 2007) y feocromocitoma (Favier *et al.*, 2002).

Mimetismo vascular en el carcinoma inflamatorio mamario

En el mismo año que se describió por primera vez el mimetismo vascular en el melanoma intraocular (1999), otro grupo de investigación (Nasu *et al.*, 1999) describió un modelo animal creado a partir de adenocarcinoma mamario, en el que se había observado que los vasos sanguíneos del intersticio tumoral eran positivos al Factor von Willebrand (vWF), aunque la tinción de los vasos intratumorales era irregular. Estos investigadores sugirieron que la sangre se filtraba desde los vasos y se creaba un camino a través de las células tumorales, de forma que se comenzaba a conducir el flujo sanguíneo (Nasu *et al.*, 1999). A pesar de esas sospechas, hasta el año 2001 no se observó por primera vez el fenómeno de mimetismo vascular en el cáncer mamario. Dicho descubrimiento se realizó en un modelo de ratón xenotransplantado con CI humano (WIBC-9) (Shirakawa *et al.*, 2001).

Shirakawa *et al.*, establecieron un modelo de ratón xenotransplantado (WIBC-9) que preservaba las características histológicas y biológicas del CI humano, con eritema de la piel, marcada afectación linfática y alto grado de metástasis. Los tumores (CI) de este modelo experimental, carecían de formaciones endoteliales, de necrosis y de fibrosis en su zona central sólida. Por el contrario, ésto no sucedía en otros modelos de ratones (MC-2, MC-5 y MC-18) a los que se les transplantaban células tumorales de cáncer mamario no CI; estos últimos presentaban frecuentemente una zona central de fibrosis y necrosis. Mediante microscopía electrónica de contraste de fase, se pudo observar la existencia de acúmulos de sangre no rodeados de células endoteliales en los tumores WIBC-9. Por tanto, se comprobó que no había una estructura vascular entre las células tumorales y los eritrocitos, y que se trataba del fenómeno de mimetismo vascular (Shirakawa *et al.*, 2001). Histológicamente, también se observó que el margen tumoral del tumor WIBC-9 mostraba una mayor densidad microvascular e inmunoreactividad al marcador endotelial CD31 (marcador de células endoteliales) que la observada en los tumores de los ratones xenotransplantados con tumor mamario no CI (MC-5). Este fenómeno podría deberse a una mayor expresión de factores angiogénicos en el tumor WIBC-9, que favorecen la aparición de nuevos vasos a partir de otros pre-existentes. Sin embargo, la zona central del tumor WIBC-9 no mostraba evidencia de angiogénesis, siendo el marcador CD31 negativo, mientras que el tumor MC-5 presentaba algunas zonas CD31 positivas en el centro. Todo esto sugiere que el mimetismo vascular de WIBC-9 consiste en un proceso hemodinámico que alimenta a sus células tumorales (Shirakawa *et al.*, 2001).

Posteriormente, se realizaron cultivos *in vitro* a partir de células tumorales del tumor WIBC-9 y se observó también que estas células formaban estructuras tubulares y bucles consistentes en cordones sólidos con una base de matriz extracelular cubiertas externamente por células tumorales, sin la presencia de células endoteliales. Las características observadas fueron similares a las descritas en los estudios *in vivo*, puesto que esos canales también contenían eritrocitos en su interior (Shirakawa *et al.*, 2001). Por tanto, las características histológicas más destacadas del tumor WIBC-9 fueron: la presencia de acúmulos de sangre no rodeados de células endoteliales, la existencia de estructuras tubulares y bucles en la zona sólida central y la ausencia de necrosis y fibrosis en la zona central.

Una vez demostrada la presencia de MV en el modelo *in vivo* del CI mamario humano xenotransplantado (WIBC-9), el mismo equipo de investigación estudió la hemodinámica del mimetismo vascular en este modelo de CI mamario (Shirakawa *et al.*, 2002b; Shirakawa *et al.*, 2003). Para ello utilizaron una técnica de microangiografía dinámica por resonancia magnética (*Dynamic micro-MRA*) en ratones xenotransplantados de CI mamario (WIBC-9) y tumor mamario no CI (MC-2, MC-5 y MC-18). Mediante inyección intravascular, administraron un agente de contraste macromolecular [G6D-(1B4M-Gd)₂₅₆] para comprobar su presencia mediante resonancia magnética (RM). Con anterioridad a estos estudios, se consideraba imposible comprobar la conexión entre MV y la angiogénesis; así como comprobar la existencia del flujo sanguíneo en MV usando angiografía, ya que no existían agentes de contraste intravascular para RM que no escaparan a través de las paredes vasculares (Shirakawa *et al.*, 2002b). Con ese nuevo contraste, se reducía la salida del mismo a través de la pared vascular (Kobayashi *et al.*, 2001). Las imágenes obtenidas antes y después de la administración de contraste mostraron que en la región marginal del tumor, tanto del modelo WIBC-9 como del MC-5, la señal aumentaba gradualmente en intensidad, lo que explicaría la conexión entre los neovasos y los vasos pre-existentes y su hemodinámica (fenómeno de angiogénesis). En la zona central del tumor, WIBC-9 mostraba puntos en los cuales la señal aumentaba gradualmente en intensidad (en concordancia con la intensidad observada en la zona marginal), mientras MC-5 presentó una pérdida de señal asociada a una necrosis central. Esto explicaría la conexión entre el MV y la actividad neovascular que rodea las células tumorales. Por último, para analizar la hemodinámica en MV y la angiogénesis en WIBC-9 se midió la intensidad del contraste a lo largo del tiempo (pixels per mm² / min) en la zona central y marginal del tumor. Este valor en el área central (correspondiente con la hemodinámica de MV) fue, en términos generales, acorde al de la zona marginal tumoral (correspondiente a la hemodinámica de la angiogénesis). En resumen, se demostró la existencia de flujo sanguíneo en el fenómeno de MV y una conexión entre los canales del MV y de angiogénesis. Además, el valor de la intensidad de la zona marginal en el WIBC-9 fue cuatro veces mayor que el observado en MC-5, hallazgo que concuerda con lo descrito previamente por inmunohistoquímica (CD31) (Shirakawa *et al.*, 2002b).

La relevancia funcional del fluido conducido por estos canales no está del todo clara. Este fluido podría suministrar nutrientes y oxígeno en tumores muy agresivos y así evitar la necrosis del tumor. Alternativamente, podría equivaler a una respuesta edematosa

inflamatoria, porque se incrementa la presión sanguínea haciendo que el fluido escape y sea conducido al tejido conectivo siguiendo los espacios entre el tejido. Por otro lado, la estructura única de los canales de MV facilitaría las metástasis hematógenas de las células tumorales, que por su posición pueden escapar directamente al flujo sanguíneo (Zhang *et al.*, 2007), aunque esta última posibilidad no ha sido aún demostrada.

Posteriormente, se realizó un estudio en 331 biopsias quirúrgicas de cáncer mamario humano, para determinar la existencia de MV y comparar los tiempos de supervivencia entre los casos de cáncer con y sin MV (Shirakawa *et al.*, 2002d). En cuanto a la presencia de MV, el estudio histopatológico (H-E y Giemsa) reveló que el 7,9% de los casos presentaban estructuras tubulares sólidas compatibles con MV, de los cuales el 15,8% eran casos de CI mamario y el 7,4% eran no CI mamarios, diferencia no estadísticamente significativa. Este dato sugiere que el MV no es un fenómeno exclusivo del carcinoma inflamatorio mamario, sino que puede estar presente en cualquier cáncer mamario (Shirakawa *et al.*, 2002d). El hecho de que el MV no ocurra sólo en los casos de CI mamario, también se ve avalado por otro estudio en carcinomas mamarios primarios y sus metástasis regionales (Buijs *et al.*, 2004). En este estudio, además de los vasos sanguíneos tumorales, se observaron unas redes de canales PAS+ en las que se encontraron eritrocitos en su interior de forma ocasional. Según Shirakawa *et al.*, (2002d), de los casos que presentaron MV (7,9%), el 84,6% mostraban formación de pseudo-comedones, siendo este porcentaje mucho mayor que en el grupo que no presentó MV. Según la definición clásica, un comedón está formado por restos de células tumorales necróticas en el área central del nido tumoral; sin embargo, en estos casos de MV se apreciaron células sanguíneas en lugar de restos necróticos. Las zonas de MV estaban rodeadas por un estroma asociado al tumor rico en fibras elásticas positivas a la tinción de van Gieson (EVG), donde se producía la angiogénesis. El fenómeno fue denominado *MV acompañado por formación de pseudo-comedones*. A mayores aumentos (H-E, Giemsa, EVG) se apreciaron los acúmulos de eritrocitos directamente rodeados por células tumorales (MV) sin la participación de células endoteliales (Shirakawa *et al.*, 2002d).

En el estudio de supervivencia, se empleó la clasificación TNM (tamaño del tumor, metástasis a ganglios, metástasis a distancia) y se compararon los grupos con y sin presencia de MV. La distribución de los casos según el sistema TNM fue similar en los grupos con MV y sin MV (grupo no-MV). Sin embargo, el grupo MV tenía una mayor tasa de metástasis hematógena (hígado, hueso, pulmón) que el grupo no-MV y una

supervivencia total 60 meses menor que el grupo no-MV (Shirakawa *et al.*, 2002d). En otro estudio pronóstico donde se evaluó la relación entre MV en carcinoma mamario primario y en la metástasis del ganglio con la supervivencia, se observó que aquellas mujeres con presencia de canales PAS+ (MV) en el ganglio tenían un peor pronóstico y éste estaba inversamente relacionado con la complejidad del patrón PAS+ (mayor complejidad, menor supervivencia). Sin embargo, la presencia de estos patrones en el tumor primario no estaba relacionada con el pronóstico, probablemente debido a la presencia de otras estructuras PAS+/actina de músculo liso+ que dificultan la interpretación (Buijs *et al.*, 2004). Otros estudios también muestran una relación entre MV y una menor supervivencia en melanomas (Maniotis *et al.*, 1999), tumores prostáticos (Sharma *et al.*, 2002) y rhabdomyosarcomas (Sun *et al.*, 2004).

Es destacable que, a pesar de existir evidencias de este fenómeno de mimetismo vascular en el carcinoma inflamatorio mamario de la mujer, y de la semejanza que presenta el CI mamario canino con el humano; en la actualidad no existen estudios sobre este tipo de vascularización en tumores de la especie canina.

Aspectos moleculares del mimetismo vascular

En el mimetismo vascular, existen tres factores que gobiernan la formación de patrones de canales funcionales de microcirculación (Sood *et al.*, 2004), la plasticidad de las células tumorales altamente malignas, la capacidad de remodelación de la matriz extracelular y la conexión de los canales de MV con los vasos del hospedador para poder adquirir el aporte de sangre.

Sin embargo, aún no se conocen en profundidad los mecanismos moleculares o los factores que se encuentran implicados en este fenómeno de vascularización tumoral. Se han realizado numerosos estudios en diferentes tipos tumorales y en cada uno de ellos se ha postulado la participación de diferentes moléculas en la formación de dichos canales de MV. Esto se debe a que los diferentes tipos tumorales expresan un determinado rango de genes asociados al endotelio y este diferente nivel de expresión podría estar ligado al origen embriogénico del tipo celular y a sus diferentes estados de diferenciación (Hendrix *et al.*, 2003a). En esta revisión bibliográfica se presta atención principalmente a los hallazgos encontrados en los estudios realizados en cáncer de mama y en especial en el CI mamario.

Para conocer las moléculas relacionadas con MV en el CI mamario, Shirakawa *et al.*, realizaron estudios de citometría de flujo, de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (*real time-polymerase chain reaction*, RT-PCR), de ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*, ELISA), e inmunohistoquímica (IHQ) *in vivo* en los ratones xenotransplantados de CI mamario WIBC-9 y de tumor mamario no CI (MC-2, MC-5 y MC-18), e *in vitro* en cultivos celulares de los mismos tumores. Estos autores observaron que los canales eran PAS+, que sólo los ratones WIBC-9 contenían ErbB-2 y que diversos factores angiogénicos humanos (angiopoyetina-1 (Ang-1), VEGF y bFGF) y del ratón (flt-1 (VEGFR-1), integrina β_3 , VEGF, receptor de angiopoyetina-2 (Tie-2) y CD31) estaban expresados en mayor proporción en los xenotransplantados CI que en los no CI. La integrina $\alpha_v\beta_3$, que induce angiogénesis en el endotelio, también estaba más expresada en el WIBC-9. Por el contrario, los factores relacionados con la linfangiogénesis, VEGF-C, VEGF-D y VEGFR-3 (receptor de los anteriores factores), no se detectaron en WIBC-9 (Shirakawa *et al.*, 2001).

Asimismo, estos autores realizaron un estudio para establecer qué moléculas estaban implicadas en los tumores mamarios donde se encontraba el fenómeno de MV, en el que observaron que no existía diferencia significativa en cuanto a la positividad a los RE y RP entre el grupo de tumores con MV y el grupo de tumores sin MV. Sin embargo, sí existían diferencias en cuanto a la expresión inmunohistoquímica y mediante RT-PCR de algunos factores angiogénicos; así, el grupo MV expresaba VEGFR-1 (50%) y Tie-1 (63%) mientras los no-MV eran todos negativos a estas moléculas. Todos los casos (MV y no-MV) fueron positivos a VEGF, Ang-1 y Ang-2, pero el grupo MV tenía una expresión significativamente mayor de VEGF y Ang-2 que los casos no-MV. Por el contrario, los dos grupos fueron negativos al receptor de trombina y al marcador de células endoteliales CD31. Estos resultados podrían indicar la formación de canales vasculares *de novo* por células tumorales, junto con la expresión de los genes VEGFR-1 y Tie-2 (Shirakawa *et al.*, 2002d). Posteriormente, en otro estudio en carcinomas mamarios no CI se detectó mediante inmunohistoquímica que las células tumorales que se encontraban formando canales de MV eran negativas a marcadores vasculares como vWF, CD31 y VEGFR-3, a excepción de alguna célula que fue positiva al marcador CD31 (Buijs *et al.*, 2004).

Por otro lado, en los últimos años se están realizando estudios para determinar el papel de la enzima ciclooxigenasa-2 (COX-2) en el cáncer de mama. Esta molécula participa en el proceso de angiogénesis tumoral (Tsujii *et al.*, 1998; Rozic *et al.*, 2001) y

además parece estar relacionada con la formación de MV. En un estudio realizado en cultivos celulares de células tumorales de cáncer mamario, las células capaces de formar MV presentaban una elevada expresión de COX-2, mientras que las que no desarrollaban MV tenían niveles moderados de COX-2 (Basu *et al.*, 2006).

En cuanto a la relación entre marcadores de citoesqueleto y el fenómeno de MV se han publicado estudios que demuestran que los filamentos intermedios citoqueratinas (marcador epitelial) y vimentina (marcador mesenquimal), son co-expresados tanto en melanoma como en tumores mamarios, confirmando a éstos un fenotipo agresivo, que sugiere que se ha producido una reversión genética a un fenotipo embriogénico (Hendrix *et al.*, 1997; Thomas *et al.*, 1999). Solamente hemos encontrado un estudio en tumores mamarios con MV en el que mediante inmunohistoquímica se detectó una tinción irregular a vimentina y una positividad a actina de músculo liso en los canales PAS+ (MV) (Buijs *et al.*, 2004), pero no hay datos acerca de las citoqueratinas. En estudios *in vitro* con células de melanoma, se ha observado que las células altamente agresivas expresaban citoqueratinas 8, 18 y vimentina y eran capaces de formar MV, mientras que aquellas escasamente agresivas, no expresaban estos marcadores y no formaban MV (Folberg *et al.*, 2000).

Por último, aunque no existen publicaciones sobre el papel de las metaloproteinasas de matriz extracelular (MMP) como MMP-1, -2, -9 y -14 y de la cadherina del endotelio vascular (*vascular endothelial cadherin*, VE-cadherina) en tumores mamarios que contienen MV, estos factores parecen ser de importancia en la formación de los canales en otros tumores no mamarios con MV (Zhang *et al.*, 2007). Las MMPs se expresan abundantemente en las células tumorales formadoras de MV en melanoma (Seftor *et al.*, 2002; Seftor *et al.*, 2001) y dicha expresión se asocia a la unión de estas células tumorales a la laminina de la membrana basal que las rodea (Hess *et al.*, 2003). En cuanto a VE-cadherina, que tiene un papel importante en la formación de uniones entre células endoteliales (Hendrix *et al.*, 2003b), se ha descrito su expresión en células tumorales de melanoma altamente malignas, mientras que en células menos malignas no se expresa (Hendrix *et al.*, 2001). Además, VE-cadherina está estrechamente relacionada con la formación de canales de MV en los melanomas (Hendrix *et al.*, 2001).

3.2. Linfangiogenesis tumoral

En las últimas décadas, en diversos estudios se ha indicado que el sistema linfático participa en el desarrollo tumoral. En algunos tipos de cáncer, como el mamario, la primera ruta de dispersión tumoral se realiza a través de los vasos linfáticos (Perou *et al.*, 2000; Schoppmann *et al.*, 2004; Vleugel *et al.*, 2004; Aoki y Tosato, 2005). Los ganglios regionales son generalmente el primer lugar afectado por metástasis (Hillen y Griffioen, 2007). En el cáncer de mama de la mujer, el estado de afectación del ganglio regional es el factor pronóstico más importante; los pacientes con metástasis al ganglio axilar en el momento del diagnóstico tienen peor pronóstico que aquellos pacientes que no presentan metástasis (Fisher *et al.*, 1983; Carter *et al.*, 1989).

En la literatura existen relativamente pocos estudios específicos del sistema linfático, debido a que no existían marcadores específicos capaces de distinguir el endotelio sanguíneo del linfático. La posibilidad de aislar y cultivar células endoteliales linfáticas ha permitido la identificación de diversos marcadores específicos de la vasculatura linfática (Hillen y Griffioen, 2007). El primer marcador linfático identificado fue el receptor del factor de crecimiento del endotelio vascular-3 (VEGFR-3) (Kaipainen *et al.*, 1995), aunque posteriormente se han identificado otros marcadores como la molécula del receptor del ácido hialurónico, el receptor-1 del endotelio vascular linfático (LYVE-1) (Banerji *et al.*, 1999), la molécula denominada podoplanina (Breiteneder-Geleff *et al.*, 1999), el factor de transcripción Prox-1 (Oliver y Detmar, 2002) y más recientemente el anticuerpo monoclonal D2-40 (Kahn *et al.*, 2002; Kahn y Marks, 2002), que presenta una elevada sensibilidad y especificidad para el marcaje de vasos linfáticos en neoplasias mamarias (Van der Auwera *et al.*, 2005; Marinho *et al.*, 2008). De la misma forma que las células endoteliales sanguíneas, las células endoteliales linfáticas son inactivas en condiciones fisiológicas; por ello, parece probable que la formación de nuevos vasos linfáticos se desencadene de una forma similar a como ocurre en la angiogenesis de los vasos sanguíneos. En la actualidad, se han identificado un amplio rango de factores/receptores linfangiogenicos que son producidos por las células tumorales (Hillen y Griffioen, 2007). Existen diversos estudios que avalan la importancia de ciertas moléculas en el desarrollo de la linfangiogenesis en los tumores mamarios, como son los factores de crecimiento del endotelio vascular -C y -D (VEGF-C/ VEGF-D) y su receptor-3 (VEGFR-3 (Flt-4)) (Skobe *et al.*, 2001; Stacker *et al.*, 2001).

Por otro lado, también se ha localizado la molécula LYVE-1 en el melanoma cutáneo agresivo (Laakkonen *et al.*, 2002). Ese resultado implica que el fenómeno de MV podría, no sólo reemplazar parcialmente la función de los vasos sanguíneos, sino también estar relacionado con la circulación linfática y, quizás, podría existir una red de mimetismo linfático (Hendrix *et al.*, 2003a).

Hasta el momento no se han encontrado en la bibliografía estudios de linfangiogénesis con marcadores específicos en los tejidos caninos.

3.3. Factores de crecimiento del endotelio vascular y sus receptores

Tanto la angiogénesis, la formación de nuevos vasos sanguíneos, como la linfangiogénesis, la formación de nuevos vasos linfáticos, son procesos complejos en los que están implicados diferentes mecanismos de señales. El principal sistema que participa en ambos procesos es la familia de proteínas de VEGF y sus receptores asociados. Este sistema se compone de una familia de glicoproteínas que actúan como factores de crecimiento (VEGF-A, -B, -C, -D) y el factor de crecimiento placentario (*placental growth factor*, PLGF) (Ferrara y Davis-Smyth, 1997). Éstos se unen selectivamente, con diferente afinidad, a tres receptores que pertenecen a una superfamilia de receptores tirosina-kinasa transmembrana que se conocen como VEGFR-1, VEGFR-2 y VEGFR-3 (Partanen y Paavonen, 2001). Aunque inicialmente se pensó que VEGF era un factor específico de células endoteliales, recientes estudios han identificado diversos componentes de esta familia en células no endoteliales (Liang y Hyder, 2005; Mohammed *et al.*, 2007a; Mylona *et al.*, 2007a). La familia VEGF actúa como un mitógeno endotelial potente y selectivo que induce una rápida y completa respuesta angiogénica. VEGF (VEGF-A), es el que se ha estudiado más extensamente y está implicado en la inducción de angiogénesis tumoral, mientras VEGF-C y VEGF-D principalmente ejercen su influencia en el endotelio linfático (Olofsson *et al.*, 1999).

3.3.1. Factor de crecimiento del endotelio vascular –A (VEGF-A)

El factor de crecimiento del endotelio vascular-A (*vascular endothelial growth factor-A*, VEGF-A) es una citocina multifuncional secretada por una gran variedad de células, que representa un papel esencial en la vasculogénesis y la angiogénesis (Fox *et al.*, 2001). Durante la transcripción se produce una unión alternativa de este factor, dando lugar a múltiples isoformas maduras con diferente longitud de aminoácidos (VEGF-A₁₆₅, -A₁₂₁, -

A₁₈₉, -A₂₀₆), que son capaces de inducir la proliferación y migración de las células endoteliales (Ferrara y Bunting, 1996). Las dos formas que típicamente se producen en las células endoteliales y tumorales son VEGF-A₁₆₅ y VEGF-A₁₂₁ (Folkman, 1995a; Ferrara, 2002). El factor de crecimiento del endotelio vascular-A es producido y secretado por diferentes tipos celulares normales y su expresión está incrementada en las células tumorales de una gran variedad de tumores, incluidos los mamarios (Brown *et al.*, 1999). Este factor puede unirse a dos receptores, VEGFR-1 y VEGFR-2 (Ferrara y Bunting, 1996; Hanahan y Folkman, 1996; Restucci *et al.*, 2004); cuando VEGF-A se une a cualquiera de sus receptores, se inicia una cascada intracelular de señales que da lugar a cambios en la expresión de genes que promueven diferentes acciones. VEGF-A no es sólo un potente mitógeno del endotelio, sino que también produce un aumento de la permeabilidad de los capilares (Dvorak *et al.*, 1991) y estimula a las células endoteliales a que secreten citocinas esenciales para la migración y la formación de brotes de nuevos vasos (Mohammed *et al.*, 2007a).

Se ha sugerido que la expresión de VEGF-A está asociada con la progresión de ciertos tipos de cánceres. Así, en el cáncer de mama de la mujer, se ha indicado que existe una relación entre la expresión de VEGF-A y una alta tasa de proliferación tumoral, negatividad al receptor de estrógenos (Fuckar *et al.*, 2006) y mal pronóstico (Linderholm *et al.*, 1999; Sledge y Miller, 2003). Sin embargo, otros autores han observado que la inmunodetección de VEGF-A en tumores mamarios humanos no se relaciona con parámetros clínicopatológicos ni con el pronóstico (Ludovini *et al.*, 2003; Ryden *et al.*, 2005; Mylona *et al.*, 2007a).

Por otro lado, se ha descrito en numerosos estudios la relación existente entre una elevada expresión de VEGF-A y un incremento de la densidad microvascular en tumores mamarios (Toi *et al.*, 1995; Hicklin y Ellis, 2005) y en otros tipos tumorales (Han *et al.*, 2001). Este hallazgo podría deberse a los múltiples efectos que VEGF-A tiene sobre las células endoteliales. Durante mucho tiempo se ha supuesto que VEGF-A no estaba asociado con la linfangiogénesis; sin embargo, hay dos estudios experimentales en los que se demuestra que el incremento de expresión de VEGF-A induce la formación de nuevos vasos linfáticos y la dilatación de los pre-existentes (Nagy *et al.*, 2002; Kunstfeld *et al.*, 2004). Recientemente, se ha demostrado en secciones de tumores mamarios humanos en parafina, que existe una asociación entre la elevada inmunoexpresión de VEGF-A y un alto índice de densidad linfovascular (DVL). Por tanto, VEGF-A parece también tener un papel

fundamental en la inducción de angiogénesis y linfangiogénesis en los tumores mamarios (Mohammed *et al.*, 2007a).

Con respecto al CI mamario hay un estudio, con datos no publicados, en cultivos celulares y en muestras tisulares procedentes de CI mamario de mujer, en el que se observó que los CI mamarios contienen elevadas cantidades de VEGF-A (Kleer *et al.*, 2000). Además, existe un estudio comparativo *in vivo* con ratones xenotrasplantados de tumores CI (WIBC-9) y tumores no CI (MC-5); en dicho estudio, se cuantificó la expresión de VEGF-A mediante RT-PCR e inmunohistoquímica, y se comprobó que dicho factor estaba significativamente más expresado en los ratones con CI (los que presentaban el fenómeno de MV), que en los no CI (Shirakawa *et al.*, 2002c).

En la especie canina, se ha demostrado que existe una mayor inmunoexpresión de VEGF-A en los tumores mamarios malignos que en los benignos y que dicha expresión se incrementa cuanto mayor es el grado de malignidad tumoral. VEGF-A se considera uno de los primeros factores que participan en la angiogénesis y que contribuye a adquirir características de malignidad y al rápido crecimiento del tumor y al desarrollo de las metástasis (Restucci *et al.*, 2002; Restucci *et al.*, 2004). Posteriormente, en otro estudio en tumores mamarios caninos se observó una inmunoexpresión de VEGF-A en el 100% de los tumores, pero no se encontró correlación entre la expresión de VEGF-A y determinados parámetros histológicos (tipo y tamaño de tumor e invasión de vasos linfáticos) y la evolución clínica de la enfermedad neoplásica (Millanta *et al.*, 2006b).

Recientemente se ha comprobado que los niveles de VEGF-A en suero de perras con tumores mamarios son mayores que los de perras sanas. También se ha comprobado que existen diferencias significativas en dichos niveles séricos entre perras con tumores malignos y benignos, existiendo relación entre la concentración de VEGF-A y la malignidad, el tamaño del tumor y el estado del ganglio (metástasis) (Kato *et al.*, 2007).

3.3.2. Factor de crecimiento del endotelio vascular- B (VEGF-B)

Existen dos isoformas del factor de crecimiento del endotelio vascular- B (*vascular endothelial growth factor-B*, VEGF-B), debido a que se produce una unión alternativa del ARNm en el momento de la transcripción: VEGF-B₁₆₇ y VEGF-B₁₈₆. Este VEGF-B se expresa particularmente en el músculo esquelético y cardíaco (Olofsson *et al.*, 1996; Yonekura *et al.*, 1999); mediante inmunohistoquímica se ha demostrado su expresión en el

citoplasma de las células neoplásicas de tumores mamarios de la mujer, ocasionalmente en el estroma peritumoral e incluso en el epitelio mamario normal de zonas adyacentes (Mylona *et al.*, 2007a). VEGF-B se une específicamente al receptor VEGFR-1 (Olofsson *et al.*, 1998); sin embargo, también forma heterodímeros con VEGF-A (Olofsson *et al.*, 1996; Olofsson *et al.*, 1998), lo que altera la especificidad por su receptor y sus efectos biológicos (Silvestre *et al.*, 2003).

Aunque VEGF-B se ha encontrado en diversos tumores, incluidos los tumores mamarios de la mujer (de Jong *et al.*, 2001), aún no se conoce bien su función. Hay autores que indican que VEGF-B podría modular la proliferación celular y el crecimiento de los vasos (Silvestre *et al.*, 2003). En un estudio realizado en pacientes con cáncer de mama se encontró que la inmunoexpresión de VEGF-B se asocia con un menor tiempo libre de enfermedad (TLE) y de supervivencia total (ST) y con la afectación de ganglios (Mylona *et al.*, 2007c). Sin embargo, en otro estudio se observó que VEGF-B no se encontraba asociado al pronóstico de las pacientes con cáncer de mama, aunque sí lo estaba con la metástasis al ganglio (Gunningham *et al.*, 2001).

En la actualidad, aún no se han realizado estudios de este factor en el carcinoma inflamatorio humano, ni en tumores mamarios caninos.

3.3.3. Factor de crecimiento del endotelio vascular –C (VEGF-C)

El factor de crecimiento del endotelio vascular-C (*vascular endothelial growth factor-C*, VEGF-C) se produce en forma de dímero pre-péptido y sufre un proceso de proteólisis en la matriz extracelular para madurar a una forma que tiene elevada afinidad por su receptor (VEGFR-3), que se encuentra en la superficie de las células endoteliales linfáticas, induciendo así el proceso de linfangiogénesis. Existe otra forma de este péptido que se puede unir, aunque con menor afinidad, a VEGFR-2 induciendo angiogénesis (Joukov *et al.*, 1996). La expresión de VEGF-C se produce fundamentalmente en los tejidos adultos como el corazón, músculo, ovario e intestino delgado (Salven *et al.*, 1998). Además, se expresa en una gran variedad de tumores en la especie humana como el cáncer de mama (Salven *et al.*, 1998; Kurebayashi *et al.*, 1999), tumores de células escamosas, sarcomas, melanomas, carcinomas pulmonares, etc (Salven *et al.*, 1998).

Existen diversos estudios acerca de la implicación de este factor en el proceso de la linfangiogénesis, densidad de vasos linfáticos, metástasis regional y a distancia e importancia del mismo en el pronóstico. Los resultados obtenidos por los diferentes grupos investigadores son controvertidos. En un trabajo *in vivo* en ratones xenotransplantados de tumores mamarios, se ha demostrado que VEGF-C se encuentra asociado a un incremento de la densidad de vasos linfáticos y linfangiogénesis intratumoral (Skobe *et al.*, 2001). Además, estos resultados también han sido observados en otros procesos tumorales en diferentes modelos animales (Jeltsch *et al.*, 1997; Oh *et al.*, 1997; Mandriota *et al.*, 2001). Los estudios que intentan determinar la relación de VEGF-C con el crecimiento de vasos linfáticos asociados a los tumores mamarios y la densidad de vasos linfáticos (DVL) muestran resultados variados: algunos autores han encontrado influencia del factor VEGF-C en este proceso (Karpanen *et al.*, 2001; Krishnan *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2006; Mohammed *et al.*, 2007a), mientras que otros autores indican que no existe asociación entre VEGF-C y la DVL (van der Schaft *et al.*, 2007) o que se encuentra más relacionado con el tamaño de los vasos linfáticos que con la DVL (Mylona *et al.*, 2007c).

Con respecto al papel que juega el VEGF-C en la producción de metástasis, los datos recopilados también son contradictorios. Se ha demostrado en pacientes con diversos tumores como carcinoma colorrectal, gástrico y cervical, que existe asociación entre la expresión de VEGF-C y las metástasis regionales nodales (Yonemura *et al.*, 1999; Akagi *et al.*, 2000; Ueda *et al.*, 2002; Gisterek *et al.*, 2007). Respecto al cáncer de mama, algunos autores afirman que la expresión de VEGF-C está asociada con la presencia de metástasis (Kurebayashi *et al.*, 1999; Karpanen *et al.*, 2001; Skobe *et al.*, 2001; Krishnan *et al.*, 2003; Mohammed *et al.*, 2007a), mientras que otros no encuentran dicha asociación (Gunningham *et al.*, 2000; Kinoshita *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 2002; Hoar *et al.*, 2003; Gisterek *et al.*, 2007).

En el cáncer de mama, también se ha estudiado la relación entre la expresión de VEGF-C y el pronóstico de la enfermedad. Así en un estudio se señala que un aumento de la expresión de este factor se asocia a un mayor TLE, ST y a un pronóstico favorable (Bando *et al.*, 2006). Sin embargo, este dato se encuentra en contradicción con la mayoría de la bibliografía publicada al respecto, que indica que una elevada expresión de VEGF-C se asocia a un mal pronóstico de la enfermedad (Kinoshita *et al.*, 2001; Nakamura *et al.*, 2003c; Mohammed *et al.*, 2007a; Mylona *et al.*, 2007b), o que este factor no influye en la supervivencia (Gisterek *et al.*, 2007; van der Schaft *et al.*, 2007).

Un factor determinante en el pronóstico del cáncer de mama es la invasión de los vasos linfáticos por parte de células tumorales (invasión linfovascular, ILV); algunos autores han indicado que VEGF-C podría favorecer la invasión tumoral de los vasos linfáticos (Gunningham *et al.*, 2000; Hoar *et al.*, 2003), aunque otros autores han descrito lo contrario (Kinoshita *et al.*, 2001).

Por último, parece no existir relación directa entre la expresión de VEGF-C en los tumores mamarios y el grado de malignidad tumoral, el estadio clínico, el tamaño tumoral y la expresión de RE (Gunningham *et al.*, 2000; Kinoshita *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 2002; Hoar *et al.*, 2003; van der Schaft *et al.*, 2007).

Haciendo referencia al cáncer inflamatorio mamario de la mujer, se han realizado investigaciones en las que se compara la expresión de VEGF-C en el CI mamario y otros tumores mamarios no CI. La expresión de VEGF-C mediante la técnica de RT-PCR en ratones xenotrasnplantados de CI mamario (WIBC-9) y tumor mamario no CI (MC-5) es similar (Shirakawa *et al.*, 2001; Shirakawa *et al.*, 2002c). Sin embargo, en otro estudio realizado en secciones de tejidos tumorales procedentes de mujeres con cáncer de mama, la expresión de VEGF-C mediante RT-PCR es significativamente mayor en los CI mamarios que en los no CI. En este estudio, se describe la presencia de una gran actividad linfangiogénica en los CI mamarios, que podría explicar la elevada capacidad de metastatizar que presenta este tipo tumoral (Van der Auwera *et al.*, 2004). Este papel del VEGF-C en el proceso de metástasis se ve avalado por otro estudio realizado en líneas celulares procedentes de tumores mamarios CI y no CI, donde mediante RT-PCR se observó que la expresión de VEGF-C se producía exclusivamente en los casos que presentaban metástasis a ganglios linfáticos (Kurebayashi *et al.*, 1999).

En la especie canina, no existe ningún estudio publicado sobre este factor. La única referencia relacionada con la expresión de VEGF-C en animales domésticos es un artículo publicado en la especie felina (Sarli *et al.*, 2007). En dicho estudio se evaluó la inmunoexpresión de este factor en diferentes tumores mamarios felinos (sin incluir carcinoma inflamatorio) y se observó la expresión de VEGF-C en el endotelio vascular y en las células epiteliales. Al comparar la expresión de VEGF-C en los tumores malignos y benignos y la mama normal no se encontró expresión diferente de esta molécula, ni diferencia en la cantidad de vasos positivos a este marcador. En todos los tumores se observó una relación entre el incremento de positividad de VEGF-C en el epitelio y el número de vasos positivos. Además, la expresión de VEGF-C fue significativamente

mayor en la zona intratumoral que extratumoral, posiblemente debido a que las condiciones que estimulan la angiogénesis suelen actuar en mayor medida en la zona intratumoral que en la periferia, donde la vascularización está más acentuada. Este último hallazgo se observó en tumores infiltrativos, pero no en carcinomas no infiltrativos, por lo que los autores propusieron que la expresión de VEGF-C intratumoral debía de ser mayor en los primeros debido a sus mayores necesidades angiogénicas (Sarli *et al.*, 2007).

3.3.4. Factor de crecimiento del endotelio vascular –D (VEGF-D)

El factor de crecimiento del endotelio vascular –D (*vascular endothelial growth factor-D*, VEGF-D), es una proteína que tiene un dominio central por donde se une a su receptor y unos extremos terminales NH₂- y COOH-, que se separan proteolíticamente para dar lugar a la forma madura de la proteína (Stacker *et al.*, 1999). La forma madura del factor se une a VEGFR-2 y VEGFR-3 con mayor afinidad que la forma inmadura, por lo que el proceso de proteólisis es importante para la activación del factor (Stacker *et al.*, 1999). El hecho de que se una a estos dos receptores, favorece la hipótesis de que VEGF-D puede estar implicado en la promoción de angiogénesis y de linfangiogénesis (Stacker *et al.*, 2001); sin embargo, primariamente se une al VEGFR-3 (Achen *et al.*, 1998), que se expresa fundamentalmente en el endotelio linfático (Kaipainen *et al.*, 1995) y de forma secundaria se une al VEGFR-2 (Stacker *et al.*, 1999), presente en el endotelio sanguíneo. VEGF-D se expresa en un amplio rango de tejidos normales, siendo muy abundante en corazón, pulmón y músculo esquelético (Yamada *et al.*, 1997; Achen *et al.*, 1998). Además de encontrarse en tejidos sanos, VEGF-D también se expresa en tejidos neoplásicos, lo que sugiere que VEGF-D tiene una función tanto en situaciones fisiológicas como patológicas. En situaciones fisiológicas, esta citocina podría tener un papel en la remodelación linfática y vascular en procesos como el ciclo menstrual, y en situaciones patológicas podría estar implicado en la progresión tumoral (Currie *et al.*, 2004).

Se han realizado diversos estudios en tumores mamarios en los que se evalúa la relación de VEGF-D con los procesos de angiogénesis y linfangiogénesis tumoral, con la densidad vascular, con la producción de metástasis, con el pronóstico y con la regulación hormonal. Se ha descrito que la expresión de VEGF-D en los tumores mamarios de la mujer, está relacionada con la densidad vascular linfática (DVL) (Choi *et al.*, 2005), aunque otros autores no encuentran dicha asociación con la DVL, ni con la densidad microvascular (DMV) (Mohammed *et al.*, 2007a; Mylona *et al.*, 2007c; van der Schaft *et*

al., 2007). Además, la expresión de VEGF-D, parece estar relacionada con el tamaño de los vasos linfáticos (Mylona *et al.*, 2007c) y con la invasión de los vasos linfáticos por parte de células neoplásicas mamarias (van der Schaft *et al.*, 2007). Por otro lado, se ha descrito que la elevada expresión de VEGF-D promueve los procesos de angiogénesis, linfangiogénesis y de metástasis, tanto en estudios *in vitro* (Achen *et al.*, 1998), como *in vivo* en modelos animales (Stacker *et al.*, 2001; Krishnan *et al.*, 2003). La relación de VEGF-D con la aparición de metástasis en pacientes con cáncer de mama es controvertida. Algunos autores han descrito que VEGF-D se asocia a la presencia de metástasis (Nakamura *et al.*, 2003a, b; Nakamura *et al.*, 2005; Mohammed *et al.*, 2007a), aunque otros no señalan dicha relación (Currie *et al.*, 2004; van der Schaft *et al.*, 2007), e incluso en otros estudios se ha observado una correlación inversa entre VEGF-D y la presencia de metástasis (Niki *et al.*, 2000). También existen resultados controvertidos con respecto al valor pronóstico que tiene la expresión de VEGF-D y su influencia en la supervivencia total y tiempo libre de enfermedad de mujeres con cáncer de mama. Algunos autores establecen que el aumento de la expresión de VEGF-D indica un peor pronóstico de la enfermedad, menor tiempo libre de enfermedad y de supervivencia total (Niki *et al.*, 2000; Koyama *et al.*, 2003; Nakamura *et al.*, 2003a, b; Mohammed *et al.*, 2007a), mientras que otros no encuentran dicha relación (Currie *et al.*, 2004) o no establecen una correlación entre VEGF-D y el pronóstico del cáncer de mama (Gisterek *et al.*, 2007; Mylona *et al.*, 2007c; van der Schaft *et al.*, 2007).

Con respecto al papel ejercido por el VEGF-D en el CI mamario, de nuevo es controvertido. La expresión de VEGF-D mediante RT-PCR en ratones xenotransplantados de CI mamario (WIBC-9) y tumor mamario no CI (MC-5) es similar (Shirakawa *et al.*, 2002c; Shirakawa *et al.*, 2001). Otros estudios realizados en líneas celulares (Kurebayashi *et al.*, 1999) y en secciones de tejidos tumorales (Van der Auwera *et al.*, 2004), han mostrado que la expresión, mediante RT-PCR, de este factor linfangiogénico es significativamente mayor en los CI mamarios que en los no CI (Kurebayashi *et al.*, 1999; Van der Auwera *et al.*, 2004). Además, en los CI mamarios existe correlación entre los factores VEGF-C, VEGF-D y el receptor VEGFR-3 (Van der Auwera *et al.*, 2004). De hecho, se ha afirmado que VEGF-D promueve el desarrollo de los vasos linfáticos tumorales y la entrada de células neoplásicas dentro de los vasos linfáticos en los CI mamarios (Kurebayashi *et al.*, 1999). En resumen, los CI mamarios muestran gran

actividad linfangiogenica, lo que podría explicar la gran capacidad de metástasis que presenta este tipo tumoral (Kurebayashi *et al.*, 1999; Van der Auwera *et al.*, 2004).

Poco se sabe acerca de la regulación de la expresión de VEGF-D por parte de factores como la hipoxia, factores de crecimiento, citocinas y hormonas. La regulación por parte hormonal no está clara, ya que existen diferentes resultados según el estudio consultado. Nakamura, *et al.*, observaron que no existe asociación entre VEGF-D y el estado de RE en los tumores mamarios, sugiriendo que VEGF-D muy probablemente no era regulado por los niveles de estrógenos (Nakamura *et al.*, 2003b). Currie, *et al.*, tampoco encontraron asociación entre VEGF-D y RE, pero sí observaron una relación de VEGF-D con los niveles de 17β -estradiol. Se ha descrito que VEGF-D induce el crecimiento de los vasos (angiogénesis y linfangiogénesis) y el desarrollo de metástasis mediante una acción paracrina. Las células tumorales secretan VEGF-D, que es proteolíticamente procesado y que se une a los receptores VEGFR-2 y VEGFR-3, presentes en las células endoteliales de los vasos tumorales sanguíneos y linfáticos, induciendo de esta forma la angio- y linfangiogénesis; además, este proceso facilitaría el crecimiento y la dispersión tumoral (Achen *et al.*, 1998) (**Figura 11**).

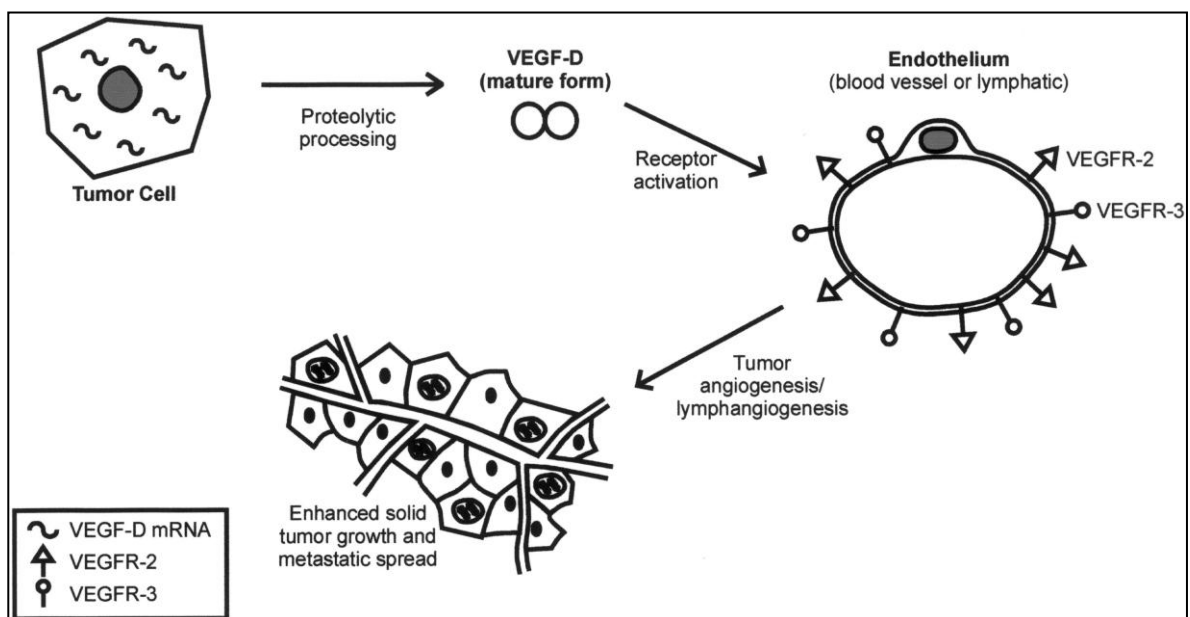


Figura 11. Modelo de regulación paracrina de la angiogénesis, linfangiogénesis y metástasis tumoral mediada por VEGF-D. Imagen tomada de Achen, *et al.*, 2002.

No se han encontrado en la bibliografía referencias sobre la expresión de VEGF-D en ninguna especie animal doméstica.

3.3.5. Receptor del factor de crecimiento del endotelio vascular -1 (VEGFR-1)

El receptor 1 del factor de crecimiento del endotelio vascular (*vascular endothelial growth factor receptor-1*, VEGFR-1 o Flt-1) se expresa, casi exclusivamente, de forma fisiológica en las células endoteliales, aunque también se ha descrito su expresión en monocitos y células musculares lisas (Clauss *et al.*, 1990). En condiciones patológicas, se ha descrito la inmunoexpresión de este receptor en células tumorales de cáncer de mama; concretamente, en el citoplasma de algunas células tumorales (59% de casos), en las células endoteliales y en el estroma peritumoral (42% casos). Esta expresión no está correlacionada con la supervivencia total (Mylona *et al.*, 2007a), aunque sí lo está con el riesgo de sufrir metástasis y recidivas (Dales *et al.*, 2003). VEGFR-1, se ha identificado como un indicador pronóstico independiente y podría considerarse como un instrumento para evaluar la agresividad tumoral y posibles estrategias terapéuticas (Dales *et al.*, 2003).

En el carcinoma inflamatorio mamario, se realizó un estudio *in vivo* donde se evaluó la expresión de este receptor, mediante RT-PCR e inmunohistoquímica. Dicho estudio se realizó en ratones xenotransplantados con CI humano (WIBC-9) o con tumores mamarios malignos no CI (MC-5). En dichos estudios se confirmó que existe una expresión significativamente mayor de VEGFR-1 en los CI que en los no CI (Shirakawa *et al.*, 2002c). La expresión de este receptor también ha sido detectada, mediante RT-PCR e inmunohistoquímica, en las células formadoras de mimetismo vascular tanto en CI mamario de ratones xenotrasplantados (Shirakawa *et al.*, 2002b; Shirakawa *et al.*, 2003), como en secciones tisulares de tumores mamarios (CI y no CI) que mostraban el fenómeno de mimetismo vascular (Shirakawa *et al.*, 2002d).

Hasta el momento no se han encontrado en la bibliografía estudios de este receptor en los tumores mamarios de la especie canina, ni en otras especies domésticas.

3.3.6. Receptor del factor de crecimiento del endotelio vascular -2 (VEGFR-2)

El receptor de los factores de crecimiento del endotelio vascular-2, (*vascular endothelial growth factor receptor-2*, VEGFR-2 o KDR/Flk-1), generalmente se conoce como el que se encuentra más ligado a la respuesta inducida por VEGF-A. Este receptor es el principal iniciador y regulador de la angiogénesis (Millauer *et al.*, 1993; Zhang *et al.*, 2002), mientras que VEGFR-1 podría ser un inhibidor de la misma en ciertos tumores (Zhang *et al.*, 2002). Se ha observado (mediante inmunohistoquímica y ELISA) que

VEGFR-2 se expresa abundantemente en las células endoteliales, en células tumorales mamarias y en líneas celulares de células tumorales de cáncer mamario (Hyder *et al.*, 1998; Kranz *et al.*, 1999; Speirs y Atkin, 1999; Price *et al.*, 2001; Nakopoulou *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2002; Dales *et al.*, 2003; Ryden *et al.*, 2003;). En los tumores mamarios, VEGFR-2 es co-expresado con VEGF-A y su expresión se incrementa cuando los tumores cambian a un fenotipo angiogénico. Además, VEGFR-2 se expresa de manera constitutiva en cultivos de tumores mamarios epiteliales, mientras que su expresión es menor en cultivos de células del estroma (Speirs y Atkin, 1999).

En un estudio en mujeres con cáncer de mama, se observó mediante análisis univariante que la positividad de las células tumorales a VEGFR-2 no estaba correlacionada con el tiempo de supervivencia ni con el riesgo de sufrir recidivas (Dales *et al.*, 2003).

En la especie canina, se han realizado algunos estudios de VEGFR-2 en tumores mamarios no CI. Se ha confirmado la presencia de VEGFR-2 en los tumores mamarios caninos invasivos, tanto en las células tumorales (89% de los casos), como en el endotelio (48%) (Millanta *et al.*, 2006b; Restucci *et al.*, 2004) y en el estroma (44%) (Millanta *et al.*, 2006b). El número de células endoteliales positivas a VEGFR-2 es mayor en los tumores mamarios malignos que en los benignos, y dentro de éstos, la expresión se incrementa al ir aumentando el grado de malignidad histológica. De igual forma ocurre con la expresión de VEGFR-2 en las células mamarias neoplásicas: se ha detectado mediante inmunohistoquímica e inmunofluorescencia que, la expresión de VEGFR-2 es mayor en los tumores mamarios malignos que en los benignos y, dentro de los malignos, es mayor en los menos diferenciados (Restucci *et al.*, 2004). El porcentaje de células neoplásicas positivas a VEGFR-2 está correlacionado con el porcentaje de células tumorales positivas al factor VEGF-A (Restucci *et al.*, 2004). Parece ser que el sistema VEGF-A/VEGFR-2 podría tener un importante papel en la transformación maligna y la progresión tumoral en los tumores mamarios caninos (Millanta *et al.*, 2006b).

3.3.7. Receptor del factor de crecimiento del endotelio vascular -3 (VEGFR-3)

El receptor del factor de crecimiento del endotelio vascular-3 (*vascular endothelial growth factor receptor-3*, VEGFR-3 o Flt-4), fue el primer marcador linfático identificado (Kaipainen *et al.*, 1995). Se trata de un receptor tirosina kinasa similar en estructura a los otros dos receptores, pero que no se une con VEGF-A (Pajusola *et al.*, 1994), ni al factor

de crecimiento de placenta (PLGF) (Sawano *et al.*, 1996), ni a VEGF-B (Olofsson *et al.*, 1998). Este receptor se activa específicamente al unirse con VEGF-C y VEGF-D y se ha asociado con el desarrollo y mantenimiento de los vasos linfáticos (Achen *et al.*, 1998; Salven *et al.*, 1998). Es bien sabido que VEGFR-3 se expresa inicialmente en todos los endotelios durante el desarrollo embriogénico, tanto en la vasculatura sanguínea como en la linfática, pero en los tejidos adultos normales está restringido a las células endoteliales linfáticas, siendo considerado el mayor regulador de linfangiogenesis en los tejidos normales (Kaipainen *et al.*, 1995). Sin embargo, a pesar de que VEGFR-3 se expresa predominantemente en el endotelio linfático de tejidos adultos, se ha demostrado que también puede ser expresado en vasos sanguíneos tumorales durante la angiogenesis y, por tanto, no puede considerarse completamente específico de vasos linfáticos (Partanen *et al.*, 1999; Valtola *et al.*, 1999; Nakamura *et al.*, 2003a). Incluso se ha descrito que VEGFR-3 estimula tanto la linfangiogenesis como la angiogenesis (Stacker *et al.*, 2001). En el cáncer de mama humano se ha comprobado que VEGFR-3 también se expresa en las células endoteliales de los vasos sanguíneos (Longatto Filho *et al.*, 2005).

Se ha investigado el papel que tiene VEGFR-3 en el pronóstico (tiempo libre de enfermedad y supervivencia total), así como en la producción de metástasis a ganglios regionales. Algunos autores han encontrado que VEGFR-3 podría influir de forma significativa en un peor pronóstico de la enfermedad (Nakamura *et al.*, 2003a; Mylona *et al.*, 2007b), mientras que otros autores no han encontrado dicha asociación (Bando *et al.*, 2006). También hay discrepancia en cuanto a la relación de este receptor con la producción de metástasis: algunos estudios avalan la asociación positiva entre este receptor y la aparición de metástasis (Nakamura *et al.*, 2003a) y otros no encuentran dicha evidencia (Gunningham *et al.*, 2000; Jacquemier *et al.*, 2000; Longatto Filho *et al.*, 2005; Bando *et al.*, 2006).

En cuanto a los trabajos realizados en carcinoma inflamatorio humano, algunos determinan la expresión de VEGFR-3 en el CI mamario en comparación con la expresión del mismo en otros tumores mamarios no CI. La expresión de VEGFR-3 mediante RT-PCR en ratones xenotransplantados de CI mamario (WIBC-9) y tumor mamario no CI (MC-5) es similar (Shirakawa *et al.*, 2001; Shirakawa *et al.*, 2002c). Este resultado concuerda con lo observado posteriormente en un estudio en el que se valoró la expresión del gen VEGFR-3 mediante RT-PCR en CI y tumores mamarios no CI (Bieche *et al.*, 2004). Sin embargo, un estudio realizado en secciones tisulares en el que se analizó

mediante RT-PCR la expresión de VEGFR-3 en CI y no CI mamarios, se observó que la expresión de este receptor era significativamente mayor en los casos de CI mamario (Van der Auwera *et al.*, 2004).

Sólo existe un estudio en animales domésticos acerca del receptor VEGFR-3 y no se ha encontrado ninguno en la especie canina. En dicho trabajo se estudia el papel de este factor en los tumores mamarios felinos (Sarli *et al.*, 2007) observándose que VEGFR-3 no se expresaba en todos los vasos linfáticos y que también era positivo el epitelio de la mama normal y neoplásica. Los resultados obtenidos con este marcador mostraron que la cantidad de vasos linfáticos era significativamente mayor en la zona extratumoral/extramamaria que en la intratumoral/intramamaria, existiendo poca cantidad de vasos linfáticos en el interior tumoral. Este hallazgo se relacionó con el hecho de que estos vasos no estaban invadidos por células neoplásicas posiblemente debido a la elevada presión dentro del tumor. La expresión de VEGFR-3 se correlacionó con la malignidad histológica de los carcinomas, con el desarrollo de metástasis y con el pronóstico. Por último, se describió que VEGFR-3 también se expresa en vasos sanguíneos y que, por lo tanto, se relaciona con la angiogénesis (Sarli *et al.*, 2007).

3.4. Otros factores relacionados con la angiogénesis tumoral

3.4.1. Enzima ciclooxygenasa-2 (COX-2)

La ciclooxygenasa (COX) es una enzima de la que se han identificado dos isoformas COX-1 y COX-2, similares en estructura proteica, pero producidas por diferentes genes y con diferente función biológica (Williams y DuBois, 1996; Hla *et al.*, 1999; Wilson *et al.*, 2004). La ciclooxygenasa-1 (COX-1) es constitutiva y se expresa en muchos tejidos, jugando un papel importante en la regulación de funciones fisiológicas como la protección del estómago, el control de la agregación plaquetaria, la función renal y la reproducción (Dubois *et al.*, 1998). Por otro lado, COX-2 está encargada del proceso de biosíntesis de prostaglandinas y tromboxanos (Ueno *et al.*, 2006) al igual que COX-1, pero COX-2 no se expresa de forma constitutiva, sino que es inducida por factores de crecimiento, citocinas, promotores tumorales, estímulos inflamatorios y otros numerosos mediadores (O'Banion *et al.*, 1992).

El papel que ejerce COX-2 en los tumores malignos ha sido investigado en diversos estudios experimentales. La expresión de la ciclooxygenasa-2 está incrementada en una

variedad de cánceres, incluido el mamario y se ha descrito que participa en determinados pasos clave de la carcinogénesis (Rozic *et al.*, 2001; Singh y Lucci, 2002; Zha *et al.*, 2004). La elevada expresión de COX-2 podría tener efectos en las propias células tumorales provocando un aumento de la invasión y metástasis (Tsuji *et al.*, 1997), un incremento de la proliferación tumoral y una inhibición de la apoptosis (Tsuji y DuBois, 1995). Además, se ha comprobado que el incremento de expresión de COX-2 produce un aumento de la angiogénesis (Tsuji *et al.*, 1998), una modulación de la inflamación (Huang *et al.*, 1998) y una inducción de la expresión de aromatasa (Brueggemeier *et al.*, 1999).

La importancia del papel de COX-2 en la angiogenesis tumoral se ha indicado en la mayoría de los tumores (Masferrer *et al.*, 2000). En los años 80, se mostró que la vascularización de los tumores de ratones xenotransplantados se reducía con la aplicación de diversos fármacos con actividad anti/COX-2 (Peterson, 1983). Asimismo, en estudios *in vitro* se ha demostrado que determinados inhibidores selectivos de COX-2 provocan una disminución de la formación tubular endotelial en líneas celulares tumorales (Tsuji *et al.*, 1998; Jones *et al.*, 1999), mientras que en estudios *in vivo* reducen la angiogénesis en diversos modelos experimentales (Majima *et al.*, 1997; Daniel *et al.*, 1999; Sawaoka *et al.*, 1999; Yamada *et al.*, 1999; Masferrer *et al.*, 2000; Leahy *et al.*, 2002). Parece probable que COX-2 actúe sobre las células epiteliales, las células endoteliales y los fibroblastos contribuyendo al proceso angiogénico, aunque hay algunas discrepancias entre los resultados de los estudios *in vitro* e *in vivo* (Majima *et al.*, 1997; Tsuji *et al.*, 1998; Daniel *et al.*, 1999; Masferrer *et al.*, 2000). Aparentemente, COX-2 regula la producción de factores pro-angiogénicos, incluyendo el VEGF, el factor de crecimiento fibroblástico, el factor de crecimiento transformante β -1, factor de crecimiento derivado de plaquetas y la endotelina-1. La ciclooxigenasa-2 podría regular la reorganización de las células endoteliales durante la angiogénesis y además estimular la síntesis de factores angiogénicos (Howe y Dannenberg, 2003).

La posible presencia de COX-2 en el cáncer de mama fue sugerida por primera vez al comprobar que los niveles de prostaglandinas estaban elevados en los tumores de mama y particularmente en aquellos que provenían de pacientes con metástasis (Bennett *et al.*, 1977; Rolland *et al.*, 1980). En el cáncer mamario humano, la expresión de COX-2 se ha investigado usando diferentes métodos de detección, como RT-PCR, *western blot* e inmunohistoquímica (Denkert *et al.*, 2004). La expresión inmunohistoquímica de COX-2 en el cáncer mamario de la mujer es variable según los estudios, aunque se sitúa alrededor

del 40% (Ristimaki *et al.*, 2002; Denkert *et al.*, 2003; Spizzo *et al.*, 2003; Wulfing *et al.*, 2003). Se ha descrito que existe un incremento de la expresión de COX-2 en los carcinomas ductales *in situ* (63%) en comparación con los carcinomas invasivos (43%) (Half *et al.*, 2002); sin embargo, en otro estudio se ha sugerido que la expresión moderada o elevada de COX-2 está presente en numerosos cánceres mamarios humanos pre-invasivos o invasivos, y en particular en aquellos con características más agresivas o peor pronóstico (Arun y Goss, 2004). El papel de COX-2 en la progresión de los tumores mamarios de la mujer ha sido explicado por múltiples mecanismos: por inactivación de las células del sistema inmune (Lala y Saarloos, 1994), por estimulación del crecimiento y supervivencia de las células tumorales (Basu *et al.*, 2005), por estimular la migración (Rozic *et al.*, 2001; Timoshenko *et al.*, 2003), por invasión de las células tumorales (Rozic *et al.*, 2001), por incremento de la angiogénesis (Lala *et al.*, 1997; Rozic *et al.*, 2001) y, recientemente, por inducción de linfangiogénesis (Timoshenko *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2008).

Por otro lado, se ha estudiado la relación entre la elevada expresión de COX-2 en los tumores mamarios humanos y diversos parámetros clinicopatológicos. En algunos estudios se ha descrito que el incremento de expresión de COX-2 se encuentra relacionada con el tamaño tumoral (Taketo, 1998; Ristimaki *et al.*, 2002) y con el estadio clínico (Taketo, 1998). Sin embargo, la mayor parte de estas investigaciones se ha centrado en la asociación entre la expresión de COX-2, la presencia de metástasis al ganglio regional (Costa *et al.*, 2002; Ristimaki *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2008), el TLE y la ST; así, se ha descrito que un aumento en la expresión de COX-2 suele asociarse a un mal pronóstico (menor TLE y ST) (Costa *et al.*, 2002; Ristimaki *et al.*, 2002; Denkert *et al.*, 2003; Spizzo *et al.*, 2003; Denkert *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2008), excepto en un estudio en el que no se encontró dicha asociación (Wulfing *et al.*, 2003).

La importancia que tiene la expresión de COX-2 en el proceso de angiogénesis de los tumores de mama en la mujer se ha visto avalada por diferentes estudios que muestran que existe una correlación significativa entre COX-2, la densidad microvascular y la expresión de VEGF-A (Costa *et al.*, 2002; Kirkpatrick *et al.*, 2002). Además, se ha observado en el cáncer mamario humano una asociación entre la presencia de COX-2 y la expresión de factores de crecimiento relacionados con la linfangiogénesis, como el VEGF-C (Timoshenko *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2008). En un estudio realizado *in vivo* e *in vitro* a partir de células de tumores mamarios humanos (CI y no CI) se ha descrito que la

expresión de COX-2 se asocia con la formación de canales de mimetismo vascular (Basu *et al.*, 2006): las células tumorales que expresan COX-2 en elevadas cantidades desarrollan canales vasculares (MV), mientras que aquellas que presentan bajos niveles de COX-2 no desarrollan dichos canales.

En la especie canina, se ha documentado la expresión de la enzima COX-2 en carcinomas de células escamosas (Pestili de Almeida *et al.*, 2001), en carcinomas de células transicionales de la vejiga de la orina (Khan *et al.*, 2000), en carcinomas renales (Khan *et al.*, 2001), neoplasias intestinales (McEntee *et al.*, 2002), carcinomas prostáticos (Tremblay *et al.*, 1999) y en neoplasias mamarias (Dore *et al.*, 2003). La existencia de COX-2 en los tumores mamarios caninos se describió por primera vez en el año 2003, en un estudio en el que mediante inmunohistoquímica se comprobó que la inmunoexpresión de COX-2 era más frecuente y de mayor intensidad en los tumores malignos que en los benignos (Dore *et al.*, 2003). Posteriormente, se han publicado diversos estudios en los que se han obtenido resultados similares: *in vivo*, mediante inmunohistoquímica (Mohammed *et al.*, 2004; Heller *et al.*, 2005; Millanta *et al.*, 2006a; Queiroga *et al.*, 2007) y ELISA (Queiroga *et al.*, 2005), e *in vitro* en líneas celulares procedentes de tumores mamarios caninos (Brunelle *et al.*, 2006). La expresión de COX-2 está relacionada con el tipo histológico tumoral, de manera que los tumores más agresivos y poco diferenciados expresan con mayor intensidad y frecuencia la enzima COX-2 que los tumores más diferenciados (Heller *et al.*, 2005; Queiroga *et al.*, 2005). Hasta el momento, existe un único estudio en el que se han determinado los niveles de COX-2 mediante ELISA, en CI mamarios caninos, que describe que los niveles de COX-2 son más elevados en los CI que en los tumores mamarios no CI y que en los tumores mamarios benignos (Queiroga *et al.*, 2005). En este mismo estudio, se ha observado una correlación entre los niveles de COX-2 y diferentes características clínicas de malignidad (mayor tamaño tumoral, ulceración de la piel, adherencia a la piel y planos profundos) en tumores mamarios no CI (Queiroga *et al.*, 2005). Además, los niveles de COX-2 están significativamente aumentados en los perros que desarrollan metástasis al ganglio regional y/o metástasis a distancia durante el seguimiento clínico (Queiroga *et al.*, 2005). Por último, la presencia de elevados niveles de COX-2 se ha asociado con un peor pronóstico de la enfermedad (menor TLE y ST) (Queiroga *et al.*, 2005; Millanta *et al.*, 2006a).

3.4.2. Hormonas esteroides

Muchas neoplasias mamarias humanas contienen receptores de estrógenos y de progesterona, que participan en la proliferación de las células tumorales (Spicer y Pike, 1994). A pesar de que durante décadas se ha reconocido que el cáncer mamario es una enfermedad endocrino-dependiente y teniendo en mente la clara evidencia de que la angiogénesis juega un papel muy importante en la progresión y metástasis de esta enfermedad, se ha prestado poca atención a la regulación que las hormonas esteroides sexuales ejercen sobre el proceso de angiogénesis y los factores relacionados con ella, principalmente el VEGF. Puesto que el tejido mamario es un tejido muy sensible al efecto de las hormonas sexuales, y que muchos tumores mamarios responden a diversas hormonas esteroides, el estradiol en combinación con la progesterona podrían estimular la proliferación de las células tumorales y controlar la producción de factores de crecimiento angiogénico o ayudar a eliminar factores anti-angiogénicos que impiden el proceso (Hyder, 2006).

3.4.2.1. Regulación por estrógenos de VEGF y VEGFR en los tumores mamarios

Se ha demostrado que los estrógenos pueden regular la acción de VEGF en las células mamarias y uterinas (Hyder *et al.*, 1996; Nakamura *et al.*, 1996; Nakamura *et al.*, 1999). En estudios *in vitro*, se ha identificado una respuesta a estrógenos por parte del gen que codifica para el VEGF, tanto en la rata como en el hombre y que interactúa tanto con el RE α como con el RE β (Hyder *et al.*, 2000; Mueller *et al.*, 2000; Buteau-Lozano *et al.*, 2002; Stoner *et al.*, 2004). Existen diversos estudios con respecto a la regulación de VEGF y sus receptores por parte de los estrógenos en los tumores mamarios. Zhang *et al.* (1995) observaron que las células con VEGF crecían mucho más rápido, formaban tumores más rápidamente y producían mayor angiogénesis, que aquellas que no tenían VEGF, cuando eran implantadas en ratones y eran suplementados con estradiol (Zhang *et al.*, 1995). De manera similar, se ha demostrado que el estradiol regula la expresión de VEGF en ratones con tumores mamarios (Nakamura *et al.*, 1996) y que los niveles de VEGF extracelular se incrementan en respuesta al estradiol en las células neoplásicas mamarias de los ratones (Dabrosin, 2003). Garvin *et al.*, (2005) demostraron que el estradiol eleva los niveles de VEGF en las células tumorales mamarias, mientras que simultáneamente, disminuyen los niveles del VEGFR-1 soluble (VEGFR-1s), incrementando la angiogénesis del entorno (Garvin *et al.*, 2005). Por otro lado, se ha observado que los estrógenos actúan como un

“interruptor” de la angiogénesis en las células neoplásicas mamarias, mediante la regulación negativa del VEGFR-1s, aunque aún no se ha determinado si se trata de un efecto hormonal directo o indirecto (Elkin *et al.*, 2004; Garvin *et al.*, 2005). Por último, también se ha demostrado en un estudio realizado en líneas celulares de tumores mamarios, que el RE α está implicado en la activación de VEGFR-2 (Higgins *et al.*, 2006).

Además de los efectos de los estrógenos sobre la producción de factores pro- y anti-angiogénicos en las células epiteliales y en la matriz extracelular, los esteroides sexuales también parecen tener un efecto directo sobre las células endoteliales (Losordo y Isner, 2001). Estos efectos incluyen el incremento de la producción y la liberación de óxido nítrico, la modulación de la expresión de moléculas de adhesión y la regulación de la proliferación (Cid *et al.*, 2002; Rubanyi *et al.*, 2002).

3.4.2.2. Regulación por progesterona de VEGF y VEGFR en los tumores mamarios

Como ocurre con los estrógenos, los efectos de la progesterona en la angiogénesis y en la expresión de VEGF en los tumores mamarios son todavía poco conocidos. Se ha comprobado que tanto la progesterona natural como la sintética inducen la presencia de VEGF en células tumorales mamarias (Hyder *et al.*, 1998; Hyder *et al.*, 2001; Mirkin y Archer, 2004; Liang y Hyder, 2005), describiéndose que dicha inducción de VEGF depende de la isoforma del receptor de progesterona (RP), pues se considera que RP-B es un inductor más potente de VEGF que RP-A (Wu *et al.*, 2004). Por otro lado, se ha demostrado que el VEGF inducido por progesterona es angiogénicamente activo, originando en las células que mostraban VEGFR-2 no sólo la proliferación de las células endoteliales, sino también la proliferación de las células tumorales del cáncer mamario por mecanismos autocrinos y paracrinos (Liang y Hyder, 2005).

3.4.2.3. Regulación por andrógenos de VEGF y VEGFR en los tumores mamarios

No existen muchos estudios que investiguen la influencia de los andrógenos en el proceso de regulación de los factores de angiogénesis en el cáncer de mama. En un estudio en líneas celulares de tumores de mama de la mujer y de ratones se demostró que la expresión de VEGF es inducida por andrógenos y que éstos favorecen el crecimiento de las líneas celulares en el cultivo y en el ratón (Ruohola *et al.*, 1999). En ese trabajo se concluye que la inducción de la expresión del ARNm de VEGF en las células de los tumores mamarios por parte de los estrógenos y andrógenos podría contribuir a la

formación de nuevos capilares y, por tanto, facilitar el crecimiento tumoral (Ruohola *et al.*, 1999).

Aunque se cree que la angiogénesis, relacionada con VEGF y sus receptores, está regulada por un control hormonal en los tumores mamarios, aún se sabe muy poco acerca del mecanismo molecular que regula su expresión o las consecuencias biológicas secundarias a la inducción o supresión de VEGF y sus receptores en el tejido mamario (Hyder, 2006).

3.5. Utilización de marcadores inmunohistoquímicos de células endoteliales

La identificación de las células endoteliales (sanguíneas y linfáticas) mediante técnicas inmunohistoquímicas puede realizarse empleando anticuerpos frente a CD31, CD34 y el Factor von Willebrand (vWF) (Kumar *et al.*, 2005). Además, existen marcadores específicos de células endoteliales linfáticas como D2-40 (Kahn *et al.*, 2002). A continuación describiremos cada uno de estos marcadores y su uso en el estudio de la vascularización tumoral, con especial referencia a los tejidos caninos.

3.5.1. Factor von Willebrand

El Factor von Willebrand (vWF) es una glicoproteína con estructura multimérica (Ruggeri y Ware, 1993) cuya expresión es específica de determinados tejidos y se encuentra confinada a las células endoteliales y a los megacariocitos (Ruggeri y Ware, 1993; Rodeghiero, 2002). El Factor von Willebrand se encuentra presente en el plasma, en los cuerpos de Weibel Palade de las células endoteliales, en los gránulos alfa de los megacariocitos y en las plaquetas, así como en la matriz subendotelial de la pared vascular. El Factor von Willebrand sirve como medio de transporte del factor VIII en el plasma, protegiendo a éste de la degradación proteolítica (Rodeghiero, 2002).

El vWF fue el primer marcador específico de endotelio que se utilizó para determinar la presencia de microvasos en estudios de diagnóstico inmunohistoquímico. Se ha demostrado que es un marcador de tumores vasculares en múltiples órganos, incluyendo el sistema nervioso central, el tracto gastrointestinal y la mama. Por otro lado, el vWF es el marcador vascular menos sensible de los que se utilizan habitualmente, siendo positivo en el 50-75% de los tumores vasculares. Además, al no producirse exclusivamente en las

células endoteliales y circular en el suero puede encontrarse en zonas de necrosis y hemorragias (Folpe y Gown, 2001).

Aunque el anticuerpo anti-vWF fue uno de los primeros y más utilizados para cuantificar microvasos, se han desarrollado nuevos anticuerpos con una especificidad mayor que la del vWF, como el anti-CD31 y anti-CD34 (Parums *et al.*, 1990; Schlingemann *et al.*, 1990).

3.5.2. CD31

CD31 es una proteína transmembrana de tipo 1 de una sola cadena, que pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas (Newman *et al.*, 1990). Es una molécula de superficie que desempeña un papel en las interacciones adhesivas entre las células endoteliales adyacentes y también entre los leucocitos y células endoteliales (Parums *et al.*, 1990). CD31 se expresa en todos los endotelios continuos, incluidos los de las arterias, arteriolas, vénulas, venas y capilares no sinusoidales. Sin embargo, no se expresa en los endotelios discontinuos. Además, CD31 se expresa de manera difusa en las superficies de los megacariocitos, las plaquetas, las células mieloides, las células *natural killer* (NK) y algunos subgrupos de células T, así como en precursores de las células B (Muller, 1996).

El anticuerpo anti-CD31 ha sido ampliamente utilizado como marcador de angiogénesis y se ha establecido como el más efectivo de todos los marcadores endoteliales para la detección de la microvascularización (Horak *et al.*, 1992; Toi *et al.*, 1993; Giatromanolaki *et al.*, 1997; Martin *et al.*, 1997; Montrucchio *et al.*, 1998). La inmunodetección de la microvascularización con anti-CD31 presenta diversas ventajas con respecto al empleo del marcador anti-vWF, siendo un método más sensible para marcar microvasos pequeños o inmaduros y células endoteliales aisladas (Giatromanolaki *et al.*, 1997). De hecho, se estableció un consenso internacional sobre la metodología y el criterio de evaluación de la densidad microvascular, que propone que la inmunotinción con anti-CD31 debe ser la forma standard de determinar estos microvasos (Vermeulen *et al.*, 1996).

Se ha detectado una elevada expresión de CD31 en células tumorales altamente agresivas de mama (Hendrix *et al.*, 2000), próstata (Sharma *et al.*, 2002) y ovario (Sood *et al.*, 2001) y se ha asociado con la desregulación de genes que podrían estar implicados en el mimetismo vascular. De hecho, la expresión inmunohistoquímica de CD31 fue descrita

en el melanoma uveal humano en relación con el fenómeno de mimetismo vascular (Maniotis *et al.*, 1999; Hoang *et al.*, 2001). En los tumores mamarios, se ha descrito la inmunoexpresión de CD31 en las células tumorales de una variante agresiva de carcinoma ductal *in situ*. Sin embargo, esta molécula no fue detectada en las células tumorales mamarias formadoras de canales (mimetismo vascular) en un modelo experimental de ratón xenotransplantado con CI mamario (WIBC-9) (Shirakawa *et al.*, 2002b).

3.5.3. CD34

CD34 es una proteína transmembrana de una sola cadena, con un peso molecular de aproximadamente 110-kDa y cuya función aún es desconocida (Moore y Lee, 2001). Esta proteína es un marcador de superficie celular que fue descrito por primera vez en las células madre hematopoyéticas inmaduras, considerándose un buen marcador de células indiferenciadas primitivas (Yogalingam y Anson, 2003). Posteriormente se ha descrito su expresión en las células endoteliales (Fina *et al.*, 1990) y en células fusiformes en varios órganos como la piel (Moore y Lee, 2001). CD34 parece tener una función como molécula de adhesión y se ha sugerido que actúa más como una molécula de señal que participando directamente como una molécula de adhesión (Healy *et al.*, 1995).

Mediante inmunohistoquímica, el anticuerpo anti-CD34 se ha utilizado como marcador de células endoteliales para determinar la angiogénesis en carcinomas mamarios humanos (Goulding *et al.*, 1995; Simpson *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 1997), no observándose positividad en las células tumorales mamarias (Traweek *et al.*, 1991).

3.5.4. Molécula D2-40

Se han utilizado diversos marcadores de células endoteliales, incluyendo el vWF, CD31, CD34, para la detección de vasos en general (sanguíneos y linfáticos). Sin embargo, el estudio específico de los vasos linfáticos estuvo limitado durante mucho tiempo por la escasa especificidad de los marcadores del endotelio linfático, siendo la identificación inmunohistoquímica de los vasos linfáticos poco fiable (Schoppmann *et al.*, 2004; Choi *et al.*, 2005). En los últimos años se han desarrollado marcadores del endotelio linfático como LYVE-1, Prox-1, desmoplanina y podoplanina (Wigle y Oliver, 1999; Ebata *et al.*, 2001; Cunnick *et al.*, 2002; Cursiefen *et al.*, 2002; Jussila y Alitalo, 2002; Franchi *et al.*, 2004). Además, se ha descubierto el anticuerpo monoclonal D2-40 (Kahn *et al.*, 2002; Kahn y

Marks, 2002) que detecta un epítipo de fijación resistente que se encuentra en una sialoglicoproteína de 40 kDa, expresada en el endotelio linfático, pero no en el de los vasos sanguíneos (Kahn *et al.*, 2002). Este anticuerpo ha mostrado ser muy sensible y específico en la detección de vasos linfáticos en muchos tejidos (Evangelou *et al.*, 2005) y especialmente en los tumores mamarios (Choi *et al.*, 2005; Van der Auwera *et al.*, 2005; Marinho *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2008). Incluso, se ha descrito que el D2-40 es el mejor anticuerpo para detección de vasos linfáticos en los casos de CI mamario (Van der Auwera *et al.*, 2005).

3.6. Densidad microvascular tumoral

Los procesos de angiogénesis y linfangiogénesis son de vital importancia en el crecimiento e invasión tumorales y en el desarrollo de metástasis (Folkman, 1997; Saharinen *et al.*, 2004). El estudio de la angiogénesis se ha realizado generalmente estimando la densidad vascular en tejidos teñidos con una variedad de marcadores endoteliales, es lo que se conoce como densidad microvascular (DMV). Además, se ha buscado la posible correlación entre la DMV, la densidad vascular linfática (DVL) y la densidad de vasos sanguíneos (DVS) con parámetros clínico-patológicos y con la evolución del paciente con cáncer mamario (Medri *et al.*, 2000; Ludovini *et al.*, 2003). Sin embargo, los resultados son variables, debido a la variedad de marcadores endoteliales empleados y a las diferentes técnicas empleadas para cuantificar los vasos (Uzzan *et al.*, 2004).

3.6.1. Densidad microvascular conjunta

El método más utilizado para determinar la vascularización tumoral ha sido el conteo del número de microvasos identificados inmunohistoquímicamente en zonas de alta densidad microvascular (*hot spot*), usando marcadores vasculares como vWF, CD34 y CD31 (Mohammed *et al.*, 2007a). Se cree que el incremento de la densidad microvascular intratumoral refleja la neovascularización secundaria a la angiogénesis y linfangiogénesis por las células tumorales y el apoyo del estroma (Horak *et al.*, 1992; Weidner *et al.*, 1992). Se han realizado numerosas investigaciones en el cáncer de mama que intentan determinar la relación existente entre la DMV y la malignidad del tumor, los diferentes factores pronóstico o la capacidad para metastatizar.

En el año 2002, Valkovic, *et al.* encontraron relación entre el grado de malignidad tumoral y la DMV. Numerosos autores han descrito que, en los tumores mamarios humanos, el incremento de la DMV se encuentra asociado a un peor pronóstico de la enfermedad y, por tanto, correlacionado con un menor tiempo libre de enfermedad y supervivencia total (Bosari *et al.*, 1992; Horak *et al.*, 1992; Weidner *et al.*, 1992; Toi *et al.*, 1993; Visscher *et al.*, 1993; Gasparini *et al.*, 1994; Martin *et al.*, 1997; Hansen *et al.*, 2000; Tsutsui *et al.*, 2003; Uzzan *et al.*, 2004; Choi *et al.*, 2005). En contra de estos hallazgos, existen diversos estudios en los que no se encontró relación entre una elevada DMV y un peor pronóstico (Hall *et al.*, 1992; Van Hoef *et al.*, 1993; Axelsson *et al.*, 1995; Costello *et al.*, 1995; Siitonen *et al.*, 1995; Morphopoulos *et al.*, 1996; Ludovini *et al.*, 2003). Por otro lado, también se han publicado resultados contradictorios con respecto a la posible correlación existente entre un incremento de DMV y una mayor posibilidad de producción de metástasis: hay autores que encuentran dicha relación (Weidner *et al.*, 1991; Valkovic *et al.*, 2002; Choi *et al.*, 2005), mientras que otros señalan que dicha relación no existe (Axelsson *et al.*, 1995; Ludovini *et al.*, 2003). Como vemos, los resultados obtenidos son muy diversos dependiendo del grupo investigador; estas variaciones pueden deberse a la gran heterogeneidad intratumoral de los tumores mamarios, pudiendo ser los valores de DMV diferentes dependiendo de la zona seleccionada, aunque también pueden deberse al uso de diferentes anticuerpos y métodos de cuantificación (Ahlgren *et al.*, 2002).

Con respecto al CI mamario, parece razonable especular que el incremento de DMV podría contribuir al comportamiento agresivo de los CI mamarios. Se ha descrito que la DMV determinada mediante IHQ es significativamente mayor en los CI mamarios que tumores mamarios no CI (McCarthy *et al.*, 2002). Posteriormente en un estudio morfológico cuantitativo de angiogénesis en CI mamario humano se ha observado que existe una intensa angiogénesis en los CI mamarios en comparación con los tumores mamarios no CI, y ésta se manifiesta por un incremento de la densidad vascular y una elevada tasa de proliferación de células endoteliales (significativamente mayor en CI mamario (media 19%) que en no CI (media 11%)) (Colpaert *et al.*, 2003). Estos datos indican que el CI mamario es un tumor altamente angiogénico (Colpaert *et al.*, 2003).

En oncología veterinaria, el papel de la angiogénesis y su correlación con el comportamiento biológico de los tumores mamarios aún se encuentra poco documentado, pero se ha descrito que la DMV está significativamente elevada en los tumores mamarios malignos en comparación con lesiones benignas, existiendo un incremento de los valores

de DMV en los casos de tumores mamarios más anaplásicos (Griffey *et al.*, 1998; Graham y Myers, 1999; Restucci *et al.*, 2000; Restucci *et al.*, 2002). La correlación entre VEGF y la DMV no está del todo clara; en el año 2002 se describió que un incremento de la expresión de VEGF en carcinomas mamarios malignos caninos estaba relacionado con un aumento de la DMV (Restucci *et al.*, 2002). Además, se encontró asociación entre valores altos de DMV y un pronóstico desfavorable (Restucci *et al.*, 2002). Sin embargo, posteriormente, otros autores no encontraron tales relaciones (Millanta *et al.*, 2006b), probablemente debido a la diferente metodología utilizada para cuantificar estos dos parámetros. Con respecto al CI mamario canino, en la actualidad, no existen datos publicados sobre la DMV.

3.6.2. Densidad vascular linfática

Aunque la importancia de la angiogénesis en la progresión tumoral es bien conocida, la capacidad de las células tumorales para inducir linfangiogénesis y los mecanismos por los cuales las células neoplásicas se diseminan a través del sistema linfático produciendo metástasis son poco conocidos (Van der Auwera *et al.*, 2004). La cuantificación de vasos teñidos positivamente por un marcador de vasos linfáticos en un área es lo que se conoce como densidad microvascular linfática (DVL) y se ha usado para determinar las características linfangiogénicas de los tumores (Choi *et al.*, 2005; Van der Auwera *et al.*, 2005; Marinho *et al.*, 2008;).

En los últimos años, tras haber obtenido marcadores específicos de células endoteliales linfáticas, se han realizado diversos estudios de linfangiogénesis en los tumores mamarios humanos, incluido en el carcinoma inflamatorio. En una reciente investigación en cáncer de mama no inflamatorio se estudió la relación entre el fenómeno de linfangiogénesis y las metástasis regionales mediante cuantificación con RT-PCR de la expresión de diversos marcadores linfáticos específicos. Se comprobó que existía mayor linfangiogénesis en los tejidos tumorales que en la mama normal y que además, aquellos tumores mamarios que presentaban metástasis en el ganglio regional mostraban mayor linfangiogénesis que aquellos que no tenían metástasis (Cunnick *et al.*, 2008).

Otros estudios en cáncer mamario han cuantificado mediante inmunohistoquímica la densidad microvascular de vasos linfáticos (DVL), utilizando el marcador de vasos linfáticos podoplanina (Schoppmann *et al.*, 2001; Schoppmann *et al.*, 2004) y los factores VEGF-C y VEGF-D (Mylona *et al.*, 2007c). En estos estudios se concluyó que los vasos

linfáticos intratumorales eran extremadamente raros, mientras que la mayoría de ellos se encontraban en la zona del estroma, en el borde de las formaciones tumorales (Schoppmann *et al.*, 2001; Schoppmann *et al.*, 2004; Mylona *et al.*, 2007c).

Con respecto al pronóstico clinicopatológico de la DVL no existe unanimidad de criterio: algunos autores han encontrado relación entre DVL y metástasis al ganglio y una asociación con un peor pronóstico de la enfermedad (Bono *et al.*, 2004; Nakamura *et al.*, 2005; van der Schaft *et al.*, 2007), pero otros autores no establecen esta importancia clinicopatológica de la DVL (Agarwal *et al.*, 2005).

El carcinoma inflamatorio mamario de la mujer muestra una marcada dispersión linfática en la mama y particularmente en los vasos linfáticos cutáneos y subcutáneos y prácticamente todos los pacientes con este tipo de cáncer presentan metástasis en ganglios cuando se diagnostica (Kleer *et al.*, 2000). Para investigar el papel de la linfangiogénesis en el carcinoma inflamatorio mamario humano y sus metástasis se han realizado investigaciones donde se cuantifica este proceso (Van der Auwera *et al.*, 2004; Van der Auwera *et al.*, 2005). Mediante cuantificación por RT-PCR de la expresión de ARNm de varios factores relacionados con la linfangiogénesis (VEGF-C, VEGF-D y VEGF-R3 (Flt-4), Prox-1 y LYVE-1) se ha observado que los niveles de los mismos son significativamente mayores en los casos de CI, con respecto a los tumores mamarios no CI (Van der Auwera *et al.*, 2004). Sin embargo, existen resultados diversos, puesto que, otros autores (Shirakawa *et al.*, 2001), no encontraron expresión de VEGF-C, VEGF-D y VEGFR-3 en sus modelos experimentales de CI mamario en las células que formaban los canales del mimetismo vascular.

Por otro lado, en secciones tisulares de CI mamario humano se ha determinado el índice de proliferación de vasos linfáticos empleando una doble tinción inmunohistoquímica, con un marcador de células endoteliales linfáticas (D2-40, LYVE-1) y con un marcador de proliferación celular (Ki-67). El porcentaje de proliferación linfática fue calculado teniendo en cuenta el número de células endoteliales linfáticas positivas a Ki-67 en 100 células endoteliales linfáticas (Van der Auwera *et al.*, 2004; Van der Auwera *et al.*, 2005; Van der Auwera *et al.*, 2006). Los resultados obtenidos en estudios comparativos entre CI mamario, tumor mamario no CI y mama normal mostraron que la proliferación linfática es significativamente mayor en los casos de CI mamario que en los casos de tumores mamarios no CI (Van der Auwera *et al.*, 2004; Van der Auwera *et al.*, 2005) y en ambos con respecto a la mama normal (Van der Auwera *et al.*, 2005). La

proliferación de células endoteliales linfáticas es reflejo de la linfangiogénesis que está en curso; el elevado porcentaje de proliferación en los CI mamarios sugiere que la linfangiogénesis contribuye en la dispersión del proceso tumoral (Van der Auwera *et al.*, 2005).

Con respecto al número de vasos linfáticos presentes, éstos se encuentran en la zona intratumoral en el 80% de los tumores mamarios no inflamatorios y en el 82% de los inflamatorios. Con la particularidad de que los tumores no CI muestran vasos linfáticos de menor tamaño, menos numerosos y ocupando un área menor que los de la zona peritumoral. En los CI mamarios los vasos linfáticos son similares en la zona intratumoral como en la periferia del tumor. Además, la presencia de vasos linfáticos intratumorales en los carcinomas mamarios no CI se relacionó con el patrón de crecimiento tumoral, encontrándose una mayor cantidad de vasos linfáticos en tumores con patrón infiltrativo que en los que desarrollan patrón expansivo. Cuando se compara el número de vasos linfáticos en los tumores con respecto al tejido mamario normal, este número fue menor, tanto en CI mamario como no CI, que en el tejido mamario normal. Este hecho podría explicarse por la destrucción parcial del estroma preexistente debido a la invasión de las células tumorales, lo que estaría también relacionado con la importancia del patrón de crecimiento tumoral con respecto al número de vasos linfáticos en los casos de tumores mamarios no CI (Van der Auwera *et al.*, 2005). En resumen, todos los datos sugieren que el CI mamario es altamente linfangiogénico, lo que explica su potencial para metastatizar a través de vía linfática (Van der Auwera *et al.*, 2004)

En la especie canina, no existen estudios de linfangiogénesis en ningún tipo de tumor, ni en tumores mamarios. Como única referencia, existe un estudio de vasos linfáticos en la especie felina, donde emplearon supuestos marcadores de células endoteliales linfáticas (VEGF-C y VEGFR-3) para determinar la cantidad de vasos linfáticos presentes en la periferia y en el interior de tumores malignos, benignos y en la zona intra- y extra-mamaria de tejido glandular mamario (Sarli *et al.*, 2007). Los resultados obtenidos con el marcador VEGFR-3 mostraron que la cantidad de vasos linfáticos es significativamente mayor en la zona extratumoral/extramamaria que en la intratumoral/intramamaria. Por tanto, existe poca cantidad de vasos linfáticos en el interior tumoral (Sarli *et al.*, 2007).

III MATERIAL Y MÉTODOS

III. MATERIAL Y MÉTODOS

1. ESTUDIO DE INMUNOFENOTIPO Y ANGIOGÉNESIS

1.1. Animales

En este estudio se han incluido 42 perras que acudieron a la consulta de Oncología Mamaria del Hospital Clínico Veterinario (HCV) de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid (UCM) en un periodo comprendido entre 1995 y 2008 y fueron diagnosticadas de Carcinoma Inflamatorio Mamario (CI) (n=22) o de tumores mamarios malignos metastásicos no-CI con grado histológico de malignidad (GHM) III (TMM no-CI) (n=20). Como controles, se han incluido 4 muestras de mama normal (MN) procedentes de perras sanas pertenecientes al animalario del Departamento de Fisiología (Fisiología Animal) de la Facultad de Veterinaria de Madrid.

En todos los casos se llevó a cabo un protocolo de evaluación clínica de animales con tumores de mama que se utiliza de forma rutinaria en la consulta de Oncología Mamaria del HCV de la UCM y que ha sido publicado previamente (Pérez-Alenza *et al.*, 1997). Dicho protocolo consta de los datos referentes a la edad, raza (**Tabla 1.**), sexo y peso del animal, una historia clínica completa y una historia clínica sobre el estado reproductivo (descripción de los celos y/o anormalidades de los mismos, administración de tratamientos hormonales y sobre los tumores mamarios previos o presentes en el momento de la visita). Posteriormente, se lleva a cabo un examen físico general y una exploración detallada de todas las glándulas mamarias y ganglios regionales. Por último, se realizan técnicas de diagnóstico por imagen (radiología y/o ecografía) para detectar la posible existencia de metástasis.

Tabla 1. Descripción del tipo tumoral (CI o TMM no-CI) o mama normal, nombre, edad y raza de cada uno de los casos incluidos en el estudio.

| Tipo y N° de caso | Nombre | Edad | Raza |
|-------------------|----------|------|-----------------------------|
| CI 1 | Ariel | 10 | Pastor Alemán |
| CI 2 | Wilma | 7 | Bóxer |
| CI 3 | Princesa | 9 | Mastín |
| CI 4 | Navy | 11 | Mestizo |
| CI 5 | Meba | 14 | Doberman |
| CI 6 | Perla | 12 | Caniche |
| CI 7 | Nena | 12 | Mestizo |
| CI 8 | Thais | 10 | Bobtail |
| CI 9 | Tara | 15 | Pastor Alemán |
| CI 10 | Nani | 13 | Basset Artesien Norma |
| CI 11 | Linda | 7 | Mestizo |
| CI 12 | Agua | 11 | Perro de Aguas |
| CI 13 | Pepi | 13 | Fox terrier |
| CI 14 | Queca | 14 | Pastor Alemán |
| CI 15 | Balu | 12 | Mestizo |
| CI 16 | Lara | 10 | Caniche |
| CI 17 | Cuqui | 10 | Pequinés |
| CI 18 | Layka | 11 | Mestizo |
| CI 19 | Queen | 11 | Pastor Alemán |
| CI 20 | Scully | 8 | Rottweiler |
| CI 21 | Sweety | 11 | West Highland White Terrier |
| CI 22 | Lua | 11 | Pastor Alemán |

| Tipo y N° de caso | Nombre | Edad | Raza |
|-------------------|------------------|------|--------------------------|
| TMM 1 | Dina | 12 | Pastor Alemán |
| TMM 2 | Tunia | 11 | Pastor Alemán |
| TMM 3 | Lady Di | 14 | Cocker |
| TMM 4 | Yuka | 11 | Yorkshire Terrier |
| TMM 5 | Milonga | 12 | Pastor Belga |
| TMM 6 | Loreta | 13 | Mestizo |
| TMM 7 | Linda | 3 | Pastor Alemán |
| TMM 8 | Lola | 13 | Cocker |
| TMM 9 | Scrofy | 10 | Caniche |
| TMM 10 | Pumuky | 16 | Mestizo |
| TMM 11 | Ñuca | 11 | Mestizo |
| TMM 12 | Chiruca | 8 | Pastor Alemán |
| TMM 13 | Blackie | 10 | Cocker |
| TMM 14 | India | 11 | Pastor Alemán |
| TMM 15 | Rascayusa | 12 | Mestizo |
| TMM 16 | Luna | 11 | Cocker |
| TMM 17 | Luna | 10 | Mastín Español |
| TMM 18 | Yeni | 14 | Teckel |
| TMM 19 | Kira | 9 | Cocker Spaniel Americano |
| TMM 20 | Meiga | 12 | Mestizo |
| MN 1 | Luna | 11 | Beagle |
| MN 2 | Kika | 7 | Beagle |
| MN 3 | Pérez | 5 | Beagle |
| MN 4 | Hernández | 5 | Beagle |

Una vez que las perras fueron examinadas y se evaluaron los tumores mamarios se realizó una cirugía mamaria para extirpar los nódulos mamarios, en todos los casos en los que éste se consideró como el tratamiento más recomendable; por otro lado, en los casos en que se sospechó de CI mamario, se llevó a cabo la toma de biopsia con aguja tru-cut.

Las lesiones se diagnosticaron como carcinoma inflamatorio cuando, tanto el criterio clínico como histopatológico fueron compatibles con este tipo tumoral. El diagnóstico clínico del CI se estableció en la consulta y atendió a las características clínicas descritas en la mujer (Tavassoli, 1999) y en la perra (Susaneck *et al.*, 1983; Pérez-Alenza *et al.*, 2001): crecimiento rápido del tumor con afectación de forma difusa de múltiples glándulas mamarias (con la presencia o ausencia de nódulo mamario) formando una placa firme, con calor en la zona, edema, eritema, y dolor. En estos casos, se tomaron muestras de tejido mamario para estudio histopatológico mediante biopsia con aguja tru-cut (n=22 perras). Los carcinomas inflamatorios se clasificaron como primario o secundario y dentro de éstos como secundario post-quirúrgico o no post-quirúrgico, siguiendo el criterio descrito en la bibliografía (Pérez-Alenza *et al.*, 2001).

El diagnóstico de los tumores mamarios no-CI se obtuvo mediante estudio histopatológico de las muestras quirúrgicas.

Tras el diagnóstico histopatológico de los tumores mamarios se determinó el tratamiento más adecuado para cada uno de los animales, de manera que se administraron tratamientos quimioterápicos y/o paliativos y se realizó un seguimiento clínico hasta el momento de la eutanasia humanitaria.

La presencia de metástasis a distancia procedentes del tumor mamario se confirmó, en todos los casos, mediante un estudio completo de necropsia, realizada tras la eutanasia humanitaria. Para clasificar el estadio tumoral de los animales elegimos el momento de la autopsia, según la clasificación tumor-linfonodo-metástasis (*Tumor-Node-Metastases*, TNM) de autopsia (TNMa). Según los principios generales del sistema de clasificación TNM para los tumores mamarios, descrito por el *American Joint Committee in Cancer* (AJCC) en su *Manual for Staging of Cancer* (Greene *et al.*, 2002; Singletary *et al.*, 2002; Sobin y Wittekind, 2002), se diferenciaron cuatro estadios.

- **Estadio I:** proceso local; no hay afectación de ganglios
- **Estadio II:** local avanzado; severa y avanzada invasión local, donde se incluye el cáncer inflamatorio
- **Estadio III:** afectación de ganglio regional
- **Estadio IV:** metástasis a distancia

Para la realización de este estudio sólo se incluyeron animales que se clasificaron dentro del estadio IV.

1.2. Muestras

1.2.1. Carcinoma inflamatorio mamario canino

Para este estudio, se han recopilado de forma retrospectiva muestras de necropsia, incluidas en parafina, de tumores mamarios de 22 perras con CI mamario incluidas en el estudio. Las necropsias se llevaron a cabo el mismo día en que se practicó la eutanasia humanitaria y se realizaron de forma ordenada, sistemática y completa, anotándose todas las lesiones macroscópicas. Todos los tumores de los que se tomaron muestra fueron identificados de forma independiente, en función de la mama a la que afectaban (R1 a R5 para la cadena mamaria derecha y L1 a L5 para la izquierda).

1.2.2. Tumores mamarios caninos malignos no-CI

Se incluyeron en el estudio 20 muestras quirúrgicas o de necropsia, incluidas en parafina, de tumores mamarios malignos metastásicos no-CI con grado histológico de malignidad (GHM) III.

Los tumores extirpados tanto quirúrgicamente, como los obtenidos en las necropsias fueron identificados siguiendo el mismo procedimiento que se ha referido para los casos de CI.

1.2.3. Mama normal

Como controles se tomaron muestras tisulares de tejido mamario normal. Dichas secciones de tejido (n=4) se obtuvieron, mediante biopsia por aguja tru-cut de las perras beagle sanas (n=4) incluidas en el estudio.

1.3. Estudio histopatológico

1.3.1. Procesado de muestras para histopatología

Todas las muestras obtenidas de las biopsias y necropsias de los animales incluidos en el estudio se han analizado en el Servicio de Anatomía Patológica del HCV de la UCM. Las muestras fueron procesadas siguiendo la metodología rutinaria del laboratorio de diagnóstico anatomopatológico. Dichas muestras permanecieron en formol tamponado comercial al 10% durante un mínimo de 24 horas a temperatura ambiente para su fijación. Las muestras se tallaron, tomando una muestra representativa de la neoplasia y se evitaron las zonas de necrosis. En el caso de los CI, se intentó incluir la zona de la epidermis y dermis superficial, para la observación de posibles émbolos tumorales. Cada pieza se colocó en un casete y se incluyó en parafina sintética mediante el uso de un procesador automático de tejidos Shandon-Elliot (modelo Bench SCE 0400). En ese proceso, los casetes se pasan automáticamente por una serie de alcoholes y bencenos para la eliminación del formol, deshidratación y la posterior inclusión en parafina sintética (*Histosec*® pastillas Merck) a 56 y 57°. A continuación, se realizaron los bloques de tejidos en parafina utilizando una unidad formadora, consola *Tissue-Teck*® (dispensador de parafina, consola térmica y crioconsola de *Miles Scientific*®).

A partir de los bloques se obtuvieron secciones de tejido en parafina de 4µm de grosor mediante un microtomo de rotación (modelo JUNG RM 2155 de *Leica*®). Para su tinción con hematoxilina y eosina (H-E) y otras técnicas histoquímicas e inmunohistoquímicas posteriores, las secciones se desparafinaron en xilol y siguieron un proceso de hidratación pasando por una serie de alcoholes de gradación decreciente hasta el agua. La deshidratación tras la tinción se realizó de forma inversa, pasando por una serie de alcoholes de grado creciente y xilol. Las preparaciones se montaron con un medio DPX (*Surgipath*®) y cubreobjetos. Por último, se realizó un estudio histopatológico valorando todas las muestras de cada animal.

1.3.2. Diagnóstico histopatológico de los tumores mamarios

Se realizó un estudio histológico de las muestras mediante tinción rutinaria con H-E. Todos los tumores mamarios caninos incluidos en el estudio (n= 22 CI, n= 20 TMM no-CI) se diagnosticaron empleando la clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS) para las neoplasias caninas y felinas (Misdorp *et al.*, 1999). El diagnóstico

histopatológico de CI se estableció cuando existió embolización masiva de células tumorales en los vasos linfáticos de la dermis superficial, de acuerdo con lo previamente publicado en la perra (Pérez-Alenza *et al.*, 2001). Para establecer el diagnóstico de carcinoma lipídico el criterio histológico adoptado fue el empleado en el cáncer de mama humano (Tavassoli, 1999). Así pues, tal como se ha descrito previamente (Peña *et al.*, 2003a), se estableció el diagnóstico de carcinoma rico en lípidos cuando más del 80% de las células tumorales presentaban gotas lipídicas en el interior de su citoplasma. Se realizó la técnica histoquímica de Sudán III mediante cortes en criostato, siguiendo la técnica rutinaria del laboratorio, a partir de muestras fijadas en formol, para confirmar la presencia de gotas lipídicas en los carcinomas ricos en lípidos. Los diagnósticos histológicos se reevaluaron posteriormente, en función de la inmunotinción con los marcadores de estirpe celular (citoqueratinas -pancitoqueratina y -14, vimentina, actina y desmina).

1.3.3. Presencia de estructuras tipo comedo

Durante la evaluación diagnóstica de la H-E de cada uno de los tejidos, también se valoró y anotó la presencia o ausencia de estructuras tipo comedo. Estas formaciones están compuestas por células tumorales que se encuentran rodeando un área necrótica central.

1.3.4. Evaluación del grado histológico de malignidad

En todos los casos se estudio la arquitectura de las neoplasias para poder establecer el grado de diferenciación celular (bien diferenciado, moderadamente diferenciado, indiferenciado).

El grado histológico de malignidad (GHM) se estableció empleando un método propio que modifica al de (Elston y Ellis, 1991), como se describe a continuación:

- **Formación de túbulos;**
 - 1: más del 75% de los túbulos presentan luz.
 - 2: 10-75% de los túbulos con luz, presencia de áreas de crecimiento sólido.
 - 3: menos del 10% de los túbulos tienen luz.
- **Pleomorfismo nuclear;**
 - 1: presencia de núcleos regulares y uniformes, de pequeño tamaño y con mínimas variaciones, ocasionalmente se observan nucléolos.
 - 2: moderada variación de la forma y tamaño nuclear, núcleos hipercromáticos, presencia de nucléolos con cierta frecuencia y algunos de ellos prominentes.

- 3: marcada anisocariosis, núcleos hipercromáticos evidentes, uno o más nucléolos prominentes.
- **Índice mitótico;** se calculó como la suma total de figuras mitóticas observadas en 10 campos a 40x, se llevó a cabo en la periferia del tumor o en las zonas más activas del mismo;
 - 1: 0 a 9 mitosis totales.
 - 2: 10 a 19 mitosis totales.
 - 3: 20 o más mitosis totales.
- Sumando los tres números obtenidos en los parámetros anteriores se calcula el **grado histológico de malignidad (GHM)**, de forma que:
 - GHM I= 2-5 puntos. Bien diferenciado.
 - GHM II= 6-7 puntos. Moderadamente diferenciado.
 - GHM III= 8-9 puntos. Pobremente diferenciado.

En este estudio únicamente se han incluido neoplasias con GHM III.

1.3.5. Células tumorales semejantes a endoteliales (ELCs)

Las preparaciones teñidas con H-E de los 42 tumores incluidos, fueron evaluadas por dos observadores para detectar la presencia o ausencia de células neoplásicas altamente malignas que se asemejan a células endoteliales, que forman canales y que se han denominado *endotelial-like cells* (ELCs) y que son compatibles con la existencia de mimetismo vascular. Mediante un barrido minucioso de cada muestra con el objetivo de 40X, se estableció la presencia de ELCs (mimetismo vascular) en los casos en que se observaron grupos de células tumorales semejantes a endoteliales por su morfología: grupos de células aplanadas dispuestas de manera que estuvieran formando un canal, con presencia de células sanguíneas o tumorales en su interior, o bien, células tumorales aisladas globosas, con un gran hueco en su interior que contiene células tumorales o sanguíneas. Este último requisito se emplea para poder diferenciarlas de células lipídicas. En todos los casos las células formadoras de esos canales (ELCs), bien en grupos o individuales, debían presentar marcadas características de malignidad histológica, principalmente núcleos gigantes con nucléolos evidentes, anisocariosis, anisocitosis, etc...

1.4. Estudio inmunohistoquímico

Los anticuerpos empleados en este estudio fueron evaluados mediante la técnica inmunohistoquímica de estreptavidina-biotina-peroxidasa. Los anticuerpos empleados, la casa comercial y el tipo de anticuerpo (monoclonal o policlonal) se resumen en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Anticuerpos empleados.

| ANTICUERPO | CASA COMERCIAL | ORIGEN |
|----------------------------------|---|------------|
| Citoqueratina (Pancitoqueratina) | AE1/AE3 <i>Master Diagnóstica®</i> | Monoclonal |
| Citoqueratina 14 | LL02 <i>AbD Serotec®</i> | Monoclonal |
| Vimentina | V9 <i>Dako®</i> | Monoclonal |
| Actina | 1A4 <i>Master Diagnóstica®</i> | Monoclonal |
| Desmina | D33 <i>Dako®</i> | Monoclonal |
| RE α | C-311: sc-787 <i>Santa Cruz Biotechnology®</i> | Monoclonal |
| RE β | 06-629 <i>Upstate®</i> | Policlonal |
| RP | 1A6 <i>Novocastra Laboratories®</i> | Monoclonal |
| RA | N-Ab-2 <i>Thermo Scientific®</i> | Policlonal |
| Factor von Willebrand | A 0082 <i>Dako®</i> | Policlonal |
| CD31 | JC70A <i>Dako®</i> | Monoclonal |
| CD34 | QBEnd-10 <i>Dako®</i> | Monoclonal |
| D2-40 | SIG-3730 <i>SIGNET®</i> | Monoclonal |
| VEFG-A | A-20 sc-152 <i>Santa Cruz Biotechnology®</i> | Policlonal |
| VEGF-D | H-144: sc-13085 <i>Santa Cruz Biotechnology®</i> | Policlonal |
| VEGFR-3 | FLT-4 IgG # 1 <i>Alpha Diagnostic International®</i> | Policlonal |
| COX-2 | N-20: sc-1746 <i>Santa Cruz Biotechnology®</i> | Policlonal |
| Ki-67 | MIB-1 <i>Master Diagnóstica®</i> | Monoclonal |

En todos los casos, como control negativo de la técnica se substituyó el anticuerpo primario por un tampón trifosfato salino (TBS).

A continuación se describen detalladamente los anticuerpos empleados, los controles positivos y la metodología, señalando las variaciones para cada anticuerpo.

1.4.1. Caracterización inmunohistoquímica de tipos celulares

Se ha llevado a cabo la inmunotinción de todas las muestras mamarias, empleando marcadores de estirpe celular, que han permitido establecer los tipos celulares que participan en las neoplasias (incluyendo las células formadoras de mimetismo vascular). Por otro lado, se determinó la presencia o ausencia de células mioepiteliales y/o miofibroblastos en cada una de las muestras tisulares. Asimismo, la evaluación de dichos marcadores sirvió para confirmar o re-diagnosticar el tipo histológico tumoral.

Para ello, se realizó la tinción inmunohistoquímica de las muestras obtenidas, a partir de los cortes en parafina, con diferentes anticuerpos monoclonales marcadores de citoesqueleto (anti-citoqueratina –pancitoqueratina 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10,14,15,16,19, anti-citoqueratina-14, anti-vimentina, anti-actina de músculo liso y anti-desmina) (ver **Tabla 2**). Se evaluó la presencia de los antígenos correspondientes en cada caso (22 CI, 20 TMM no-CI, 4 MN). Se incluyeron los controles positivos que se detallan a continuación, junto con la técnica inmunohistoquímica correspondiente. En dos casos, **CI 14 y TMM 10**, se añadió el marcaje con el anticuerpo S-100, siguiendo la técnica rutinaria del laboratorio para el anticuerpo S-100, y se valoró la inmunotinción de las células tumorales a vWF, CD31 y CD34, para establecer el diagnóstico.

1.4.1.1.Detección inmunohistoquímica de citoqueratina (pancitoqueratina)

El anticuerpo monoclonal anti-citoqueratina (pancitoqueratina) clon: AE1/AE3 está formado por un cóctel de los anticuerpos monoclonales AE1 y AE3 que reconoce simultáneamente a las citoqueratinas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 10, 14, 15, 16 y 19, por lo que se trata de un reactivo de amplio espectro para la identificación del origen epitelial de una neoplasia (Listrom y Dalton, 1987; Mygind *et al.*, 1988). Este anticuerpo no presenta reactividad cruzada frente a otros filamentos intermedios como vimentina, desmina y neurofilamentos. La técnica inmunohistoquímica empleada fue la siguiente:

1. Desparafinar e hidratar: se desparafina en xilol (10') y se hidrata mediante pases (de 5-10') por una serie de alcoholes decrecientes (100°, 96°, 70°). Se lavan las preparaciones en agua destilada (5').
2. Desenmascaramiento antigénico por calor: se someten las preparaciones a un tratamiento con calor en una olla a presión, con 2 l de tampón citrato (10mM, pH=6,0). Cuando se alcanza la presión máxima, se baja la temperatura del fuego y las preparaciones permanecen durante 2 minutos en la olla antes de abrir. Se dejan enfriar en el citrato durante 30' a temperatura ambiente.
3. Lavado I: las preparaciones se lavan 5' en agua destilada y 5' en TBS (buffer, pH=7,4).
4. Inhibición de la peroxidasa endógena: las preparaciones se sumergen en una solución de H₂O₂ (1,5 ml) en metanol (98,5 ml) durante 15'.
5. Lavado II: se realizan dos lavados de 5' cada uno en agua destilada y otros dos (5') en TBS.
6. Incubación con anticuerpo primario: se añade el anticuerpo primario y se incuba toda la noche a 4°C en una cámara húmeda. Se empleó el anticuerpo monoclonal de ratón anti-citoqueratina -pancitoqueratina (clon: AE1/AE3; *Master Diagnóstica*®, anticuerpo prediluido listo para uso).
7. Lavado III: se realizan dos lavados de 5' cada uno en TBS.
8. Incubación con anticuerpo secundario (biotinilado): se añade un anticuerpo anti-IgG de ratón obtenido en caballo (*Vector*®, BA-2000, dilución 1/400) sobre cada preparación y se incuba durante 30' a temperatura de ambiente.
9. Lavado IV: se realiza igual que el lavado III.
10. Conjugado con estreptavidina: sobre cada preparación se añade un preparado de estreptavidina conjugada con peroxidasa (*Zymed*® 43-4323, dilución 1/400) y se incuba durante 30 minutos a temperatura ambiente.
11. Lavado V: se realiza igual que el lavado III.
12. Revelado: las preparaciones se sumergen en una solución cromógena que contiene 25g de 3-3' tetracloruro de diaminobencidina (DAB) (*Sigma Chemical Co.*®, D5059) y 100 µl de H₂O₂ en 100 ml de agua destilada, durante 10 minutos.
13. Lavado VI: se lavan las preparaciones con agua corriente durante 5'.
14. Contraste con hematoxilina: las preparaciones se contrastan sumergiéndolas en hematoxilina de Harris durante 3 minutos.
15. Lavado VII: se lavan las preparaciones en agua corriente durante 10'.

16. Deshidratar y montar: se deshidratan las muestras realizando pases rápidos (30''-1' cada uno) en una serie de alcoholes ascendentes (70°, 96°, 100°) y se aclaran en xilol. Por último se montan con el medio DPX (*Surgipath®*) y cubreobjetos.

Se utilizó como control positivo una muestra de mama normal de la especie canina, con reactividad comprobada frente al anticuerpo primario empleado.

1.4.1.2.Detección inmunohistoquímica de citoqueratina 14

El anticuerpo monoclonal anti-citoqueratina 14 (clon: LL02; *AbD Serotec®*) reconoce la citoqueratina 14 y las células basales/mioepiteliales de la mama normal y displásica y de los tumores de la glándula mamaria (Griffey *et al.*, 1993).

Los pasos del 1-5 y del 7-16 son idénticos a los descritos en el apartado **1.4.1.1**

6. Incubación con anticuerpo primario: se añade el anticuerpo primario y se incuba toda la noche a 4°C en una cámara húmeda. Se empleó el anticuerpo monoclonal de ratón anti-citoqueratina 14 (clon: LL02; *AbD Serotec®*, dilución 1/1000).

Se utilizó como control positivo una muestra de mama normal de especie canina, con reactividad conocida frente al anticuerpo primario empleado.

1.4.1.3.Detección inmunohistoquímica de vimentina

El anticuerpo monoclonal anti-vimentina (clone: V9 *Dako®*, Glostrup, Denmark), es un marcador citoplasmático de células de origen mesenquimatoso, tanto en tejidos normales como en tejidos tumorales (Azumi y Battifora, 1987).

Los pasos del 1-5 y del 7-16 son idénticos a los descritos en el apartado **1.4.1.1**

6. Incubación con anticuerpo primario: se añade el anticuerpo primario y se incuba toda la noche a 4°C en una cámara húmeda. Se empleó el anticuerpo monoclonal de ratón anti-vimentina (clon: V9; *Dako®*, Glostrup, Denmark, dilución 1:1000).

Como control positivo interno se valora la positividad de las células endoteliales, con reactividad conocida frente al anticuerpo primario empleado.

1.4.1.4.Detección inmunohistoquímica de actina de músculo liso

El anticuerpo monoclonal anti-actina de músculo liso clon: 1A4 (*Master Diagnóstica*®) esta diseñado para la detección de la isoforma alfa de la actina de origen muscular, específicamente de la musculatura lisa. No presenta reacciones cruzadas con la actina de músculo esquelético ni de músculo cardiaco, ni con otras células mesenquimales, epiteliales, ni con los restantes componentes del citoesqueleto (Skalli *et al.*, 1986).

Los pasos del 1-5 y del 7-16 son idénticos a los descritos en el apartado **1.4.1.1**

6. Incubación con anticuerpo primario: se añade el anticuerpo primario y se incuba durante 2 horas a temperatura ambiente en una cámara húmeda. Se empleó el anticuerpo monoclonal de ratón anti-actina de músculo liso (clon: 1A4; *Master Diagnóstica*®). Se trata de un anticuerpo prediluido y listo para su uso, sin embargo realizamos una dilución 1:50 de el mismo, para obtener menor cantidad de reacciones inespecíficas (fondo).

Como control positivo se empleó un control interno, la tinción positiva de las células de la musculatura lisa de los vasos sanguíneos en todas las muestras tisulares de los tumores mamarios y mamas normales incluidos en el estudio.

1.4.1.5.Detección inmunohistoquímica de desmina

El anticuerpo anti-desmina clon: D33 (*Dako*®, Glostrup, Denmark) es un anticuerpo monoclonal que reacciona frente a las células del músculo liso y estriado y las células mesoteliales (Oliva *et al.*, 1995; Pollock *et al.*, 1995).

Los pasos del 1-5 y del 7-16 son idénticos a los descritos en el apartado **1.4.1.1**

6. Incubación con anticuerpo primario: se añade el anticuerpo primario y se incuba durante 2 horas a temperatura de ambiente en una cámara húmeda. Se empleó el anticuerpo monoclonal de ratón anti-desmina (clon: D33; *Dako*®, Glostrup, Denmark) a una dilución 1:100.

El control positivo tenido en cuenta fue un control interno, las células musculares lisas de los vasos sanguíneos en cada uno de los tejidos procedentes de los tumores mamarios incluidos en el estudio.

1.4.1.6. Valoración de la inmunotinción de citoqueratinas (-pancitoqueratina y -14), vimentina, actina de músculo liso, y desmina.

La valoración de la inmunotinción se realizó en todos los casos por dos observadores que desconocían la clasificación histológica de los tejidos en el momento de la observación. Ésta se consideró positiva cuando aparecía en el citoplasma de las células, como especificaban las casas comerciales.

Para cada anticuerpo se valoró la presencia o ausencia de inmunoexpresión en el citoplasma de las células neoplásicas de origen epitelial y/o mesenquimatoso. Para la valoración de los anticuerpos citoqueratina (pancitoqueratina), citoqueratina 14, vimentina, actina y desmina; consideramos un tumor positivo a estos marcadores cuando las células neoplásicas de dicho tejido fueran positivas en más de un 80% a dicho marcador. Teniendo en cuenta estos resultados los tumores se clasificaron según su origen, como se detalla a continuación:

- **Tumores de origen epitelial:** aquellos en los que las células tumorales fueron pancitoqueratina +, citoqueratina 14 + y/o -, vimentina + y/o -, actina + y/o - y desmina + y/o -. A pesar de ser de origen epitelial, pueden ser positivas a actina y desmina cuando el tumor deriva de células mioepiteliales.
- **Tumores de origen mesenquimatoso:** aquellos tumores donde las células neoplásicas fueron pancitoqueratina -, citoqueratina 14 -, vimentina +, actina +/- y desmina +/-.
- **Tumores mixtos:** aquellas neoplasias que tenían una parte del tumor con células de origen epitelial y otra parte con células de origen mesenquimatoso.

Además, se clasificaron como simples o complejos según la presencia de un tipo celular (epiteliales) o varios (epiteliales y mioepiteliales) respectivamente.

La comparación en cuanto a la inmunoexpresión de los diferentes marcadores descritos entre los tumores del grupo CI y TMM no-CI se realizó considerando la positividad o negatividad de las células epiteliales tumorales (no mioepiteliales) presentes en cada una de las muestras tisulares. Así, en la comparación entre grupos, fueron

excluidos los tumores de origen mesenquimatoso o mioepitelial y en los tumores mixtos o complejos se comparó exclusivamente la inmunotinción de las células epiteliales.

Por otro lado, se evaluó la presencia de células mioepiteliales y/o miofibroblastos mediante la confirmación inmunohistoquímica con marcadores específicos. Se estableció la presencia o ausencia de células mioepiteliales y el tipo (basales o estrelladas), la cantidad de miofibroblastos (0= no presentes, 1=escasos, 2=moderados, 3=abundantes) y su disposición dentro del tejido (en círculos concéntricos alrededor de las células tumorales o dispersos en el estroma de forma laxa o formando bandas no concéntricas). En función de la tinción IHQ se consideraron:

- **Células mioepiteliales** aquellas células que fueron pancitoqueratina + y/o citoqueratina 14 +, vimentina +, actina + y desmina +/-.
- **Miofibroblastos** aquellas células que fueron pancitoqueratina y citoqueratina 14 -, vimentina +, actina + y desmina +/-.

1.4.2. Estudio inmunohistoquímico de receptores hormonales

En todos los tejidos mamarios incluidos en el estudio, se llevó a cabo la detección inmunohistoquímica de los receptores de las siguientes hormonas esteroideas sexuales: estrógenos alfa (RE α), receptor de estrógenos beta (RE β), receptor de progesterona (RP) y receptor de andrógenos (RA) en los casos de CI (n=22), TMM no-CI (n=20) y MN (n=4). Para ello, se emplearon diferentes anticuerpos mono- o policlonales marcadores de dichos receptores hormonales (ver **Tabla 2**). En cada caso se incluyeron los controles positivos correspondientes que se detallan a continuación, junto con la técnica inmunohistoquímica correspondiente.

1.4.2.1. Detección inmunohistoquímica del RE α

1. Desparafinar e hidratar: se desparafina en xilol (10') y se hidrata mediante pases (de 5-10') por una serie de alcoholes decrecientes (100°, 96°, 70°). Se lavan las preparaciones en agua destilada (5').
2. Desenmascaramiento antigénico por calor: se someten las preparaciones a un tratamiento con calor en una olla a presión, con 2 l de tampón citrato (10mM, pH=6,0). Cuando se alcanza la presión máxima, se baja la temperatura del fuego y

- las preparaciones permanecen durante 2 minutos en la olla antes de abrir. Se dejan enfriar en el citrato durante 30' a temperatura ambiente.
3. Lavado I: las preparaciones se lavan 5' en agua destilada y 5' en TBS *tween* 0.05% (buffer, pH=7,4).
 4. Inhibición de la peroxidasa endógena: las preparaciones se sumergen en una solución de H₂O₂ (1,5 ml) en metanol (98,5 ml) durante 15'.
 5. Lavado II: se realizan dos lavados de 5' cada uno en agua destilada y otros dos (5') en TBS *tween* 0.05%.
 6. Incubación con anticuerpo primario: se añade el anticuerpo primario y se incuba toda la noche a 4°C en una cámara húmeda. Se empleó el anticuerpo monoclonal de ratón anti-receptor de estrógenos- α (clon: C-311: sc-787, Santa Cruz Biotechnology®), a una dilución 1/20.
 7. Lavado III: se realizan dos lavados de 5' cada uno en TBS *tween* 0.05%.
 8. Incubación con anticuerpo secundario (biotinilado): se añade un anticuerpo anti-IgG de ratón obtenido en caballo (Vector®, BA-2000, dilución 1/400) sobre cada preparación y se incuba durante 1 hora a temperatura de ambiente.
 9. Lavado IV: se realiza igual que el lavado III.
 10. Conjugado con estreptavidina: sobre cada preparación se añade un preparado de estreptavidina conjugada con peroxidasa (Zymed® 43-4323, dilución 1/400) y se incuba durante 45 minutos a temperatura ambiente.
 11. Lavado V: se realiza igual que el lavado III.
 12. Revelado: sobre cada preparación se añade una solución cromógena de 3,3'-diaminobencidina (DAB) (Vector Laboratories®, cat num: SK-4100).
 13. Lavado VI: se lavan las preparaciones con agua corriente durante 5'.
 14. Contraste con hematoxilina: las preparaciones se contrastan sumergiéndolas en hematoxilina de Harris durante 2 minutos.
 15. Lavado VII: se lavan las preparaciones en agua corriente durante 10'.
 16. Deshidratar y montar: se deshidratan las muestras realizando pases rápidos (30''-1' cada uno) en una serie de alcoholes ascendentes (70°, 96°, 100°) y se aclaran en xilol. Por último se montan con el medio DPX (Surgipath®) y cubreobjetos.

Como control positivo de la técnica se incluyó una muestra de tejido de mama normal de la especie canina, con reactividad conocida frente el anticuerpo primario.

1.4.2.2. Detección inmunohistoquímica del RE β

1. Desparafinar e hidratar: se desparafina en xilol (10') y se hidrata mediante pases (de 5-10') por una serie de alcoholes decrecientes (100°, 96°, 70°). Se lavan las preparaciones en agua destilada (5').
2. Desenmascaramiento antigénico por calor: se someten las preparaciones a un tratamiento con calor en una olla a presión, con 2 l de tampón citrato (10mM, pH=6,0). Cuando se alcanza la presión máxima, se baja la temperatura del fuego y las preparaciones permanecen durante 2 minutos en la olla antes de abrir. Se dejan enfriar en el citrato durante 30' a temperatura ambiente.
3. Lavado I: las preparaciones se lavan 5' en agua destilada y 5' en TBS (buffer, pH=7,4).
4. Inhibición de la peroxidasa endógena: las preparaciones se sumergen en una solución de H₂O₂ (1,5 ml) en metanol (98,5 ml) durante 15'.
5. Lavado II: se realizan dos lavados de 5' cada uno en agua destilada y otros dos (5') en TBS.
6. Bloqueo de uniones inespecíficas: se añade sobre cada preparación suero normal de cabra (*Dako*®, Glostrup, Denmark, X0907, dilución 1/25) y se incuba a temperatura de ambiente durante 30'.
7. Lavado III: se realizan dos lavados de 5' cada uno en TBS.
8. Incubación con anticuerpo primario: se añade el anticuerpo primario y se incuba toda la noche a 4°C en una cámara húmeda. Se empleó el anticuerpo policlonal de conejo anti-receptor de estrógenos- β (cat: 06-629, *Upstate*®), a una dilución 1/50.
9. Lavado IV: se realizan dos lavados de 5' cada uno en TBS.
10. Incubación con anticuerpo secundario (biotinilado): se añade un anticuerpo anti-IgG de conejo obtenido en cabra biotinilado (*Dako*®, Glostrup, Denmark, E0432, dilución 1/300) sobre cada preparación y se incuba durante 30' a temperatura ambiente.
11. Lavado V: se realiza igual que el lavado III.
12. Conjugado con estreptavidina: sobre cada preparación se añade un preparado de estreptavidina conjugada con peroxidasa (*Zymed*® 43-4323, dilución 1/400) y se incuba durante 30 minutos a temperatura ambiente.
13. Lavado VI: se realiza igual que el lavado III.

14. Revelado: las preparaciones se sumergen en una solución cromógena de 3,3'-diaminobencidina (DAB) (*Vector Laboratories®*, cat num: SK-4100).
15. Lavado VII: se lavan las preparaciones con agua corriente durante 5'.
16. Contraste con hematoxilina: las preparaciones se contrastan sumergiéndolas en hematoxilina de Harris durante 2 minutos.
17. Lavado VIII: se lavan las preparaciones en agua corriente durante 10'.
18. Deshidratar y montar: se deshidratan las muestras realizando pases rápidos (30''-1' cada uno) en una serie de alcoholes ascendentes (70°, 96°, 100°) y se aclaran en xilol. Por último se montan con el medio DPX (*Surgipath®*) y cubreobjetos.

El control positivo que se incluyó en la realización de la técnica fue una muestra de útero normal de la especie canina, con reactividad conocida con el anticuerpo primario empleado.

1.4.2.3.Detección inmunohistoquímica del RP

1. Desparafinar e hidratar: se desparafina en xilol (10') y se hidrata mediante pases (de 5-10') por una serie de alcoholes decrecientes (100°, 96°, 70°). Se lavan las preparaciones en agua destilada (5').
2. Desenmascaramiento antigénico por calor: se someten las preparaciones a un tratamiento con calor en una olla a presión, con 2 l de tampón citrato (10mM, pH=6,0). Cuando se alcanza la presión máxima, se baja la temperatura del fuego y las preparaciones permanecen durante 2 minutos en la olla antes de abrir. Se dejan enfriar en el citrato durante 30' a temperatura ambiente.
3. Lavado I: las preparaciones se lavan 5' en agua destilada y 5' en TBS (buffer, pH=7,4).
4. Inhibición de la peroxidasa endógena: las preparaciones se sumergen en una solución de H₂O₂ (1,5 ml) en metanol (98,5 ml) durante 15'.
5. Lavado II: se realizan dos lavados de 5' cada uno en agua destilada y otros dos (5') en TBS.
6. Incubación con anticuerpo primario: se añade el anticuerpo primario y se incuba toda la noche a 4°C en una cámara húmeda. Se empleó el anticuerpo monoclonal de ratón anti-progesterona NCL-PGR/2 (clon: 1A6, *Novocastra Laboratories®*), a una dilución 1/40.

7. Lavado III: se realizan dos lavados de 5' cada uno en TBS.
8. Incubación con anticuerpo secundario (biotinilado): se añade un anticuerpo anti-IgG de ratón obtenido en caballo (*Vector®*, BA-2000, dilución 1/400) sobre cada preparación y se incuba durante 30' a temperatura de ambiente.
9. Lavado IV: se realiza igual que el lavado III.
10. Conjugado con estreptavidina: sobre cada preparación se añade un preparado de estreptavidina conjugada con peroxidasa (*Zymed®* 43-4323, dilución 1/400) y se incuba durante 30 minutos a temperatura ambiente.
11. Lavado V: se realiza igual que el lavado III.
12. Revelado: sobre cada preparación se añade una solución cromógena de 3,3'-diaminobencidina (DAB) (*Vector Laboratories®*, cat num: SK-4100).
13. Lavado VI: se lavan las preparaciones con agua corriente durante 5'.
14. Contraste con hematoxilina: las preparaciones se contrastan sumergiéndolas en hematoxilina de Harris durante 2 minutos.
15. Lavado VII: se lavan las preparaciones en agua corriente durante 10'.
16. Deshidratar y montar: se deshidratan las muestras realizando pases rápidos (30''-1' cada uno) en una serie de alcoholes ascendentes (70°, 96°, 100°) y se aclaran en xilol. Por último se montan con el medio DPX (*Surgipath®*) y cubreobjetos.

El control positivo utilizado para la validación de esta técnica fue una muestra de útero normal de la especie canina sin patología alguna con reactividad conocida frente al anticuerpo primario empleado.

1.4.2.4. Detección inmunohistoquímica del RA

Los pasos del 1-5 y del 11-18 son iguales a los descritos en el apartado **1.4.2.2.**

6. Bloqueo de uniones inespecíficas: se añade sobre cada preparación suero normal de cerdo (*Dako®*, Glostrup, Denmark, X0901, dilución 1/20) y se incuba a temperatura de ambiente durante 30'.
7. Lavado III: se realizan dos lavados de 5' cada uno en TBS.
8. Incubación con anticuerpo primario: se añade el anticuerpo primario y se incuba toda la noche a 4°C en una cámara húmeda. Se empleó el anticuerpo policlonal de

conejo anti-receptor de andrógenos (clon: N-Ab-2: RB-1358, *Thermo Scientific*®), a una dilución 1/25.

9. Lavado IV: se realizan dos lavados de 5' cada uno en TBS.

10. Incubación con anticuerpo secundario (biotinilado): se añade un anticuerpo anti-IgG de conejo obtenido en cerdo biotinilado (*Dako*®, Glostrup, Denmark, E 0353, dilución 1/200) sobre cada preparación y se incuba durante 30' a temperatura ambiente.

Se utilizó como control positivo una muestra de próstata sin patología de la especie canina, con reactividad comprobada frente al anticuerpo primario empleado.

1.4.2.5. Valoración de la inmunotinción de los RE α , RE β , RP y RA

La valoración se llevó a cabo mediante la evaluación de las tinciones descritas por dos observadores que desconocían la clasificación histológica de los tejidos en el momento de la observación. La inmunotinción, para cada uno de estos anticuerpos, fue considerada positiva cuando se observó inmunoreacción en más del 10% de los núcleos de 10 campos representativos seleccionados, en caso contrario se consideró negativa.

Por otro lado, la intensidad de la tinción, se valoró como negativa= 0, baja= 1, moderada= 2 o intensa= 3.

1.4.3. Estudio inmunohistoquímico de marcadores de células endoteliales

En este apartado de la investigación se ha realizado el estudio inmunohistoquímico de diferentes marcadores vasculares para detectar células endoteliales maduras (Factor von Willebrand, CD31, D2-40) y de precursores de células endoteliales (CD34), presentes en las muestras de tejidos mamarios caninos, (CI, TMM no-CI, y MN). Para ello, se emplearon los anticuerpos y las técnicas inmunohistoquímicas detallados a continuación.

1.4.3.1. Detección inmunohistoquímica del Factor von Willebrand

Se empleó el anticuerpo policlonal anti-human *von Willebrand Factor* Code N°: A 0082 (*Dako*®, Glostrup, Denmark). El factor von Willebrand (vWF) se encuentra expresado en las células endoteliales y megacariocitos (Ruggeri y Ware, 1993; Rodeghiero, 2002). El anticuerpo reacciona con el complejo Factor von Willebrand/Factor VIII.

1. Desparafinar e hidratar: se desparafina en xilol (10') y se hidrata mediante pases (de 5-10') por una serie de alcoholes decrecientes (100°, 96°, 70°). Se lavan las preparaciones en agua destilada (5').
2. Desenmascaramiento antigénico: se someten las preparaciones a un tratamiento enzimático con tripsina al 0,01% (*Sigma®*, 37°C, durante 10').
3. Lavado I: las preparaciones se lavan 1 vez 5' en agua destilada y dos veces 5' en TBS (buffer, pH=7,4).
4. Inhibición de la peroxidasa endógena: las preparaciones se sumergen en una solución de H₂O₂ (1,5 ml) en metanol (98,5 ml) durante 15'.
5. Lavado II: se realizan dos lavados de 5' cada uno en agua destilada y otros dos (5') en TBS.
6. Bloqueo de uniones inespecíficas: se añade sobre cada preparación suero normal de cerdo (*Dako®*, Glostrup, Denmark, X0901, dilución 1/20) y se incuba a temperatura de ambiente durante 30'.
7. Incubación con anticuerpo primario: tras retirar el suero normal, se añade el anticuerpo primario y se incuba toda la noche a 4°C en una cámara húmeda. Se empleó el anticuerpo policlonal de conejo anti-*human von Willebrand Factor* (clon: A 0082, *Dako®*; Glostrup, Denmark), a una dilución 1/900.
8. Lavado III: se realizan dos lavados de 5' cada uno en TBS.
9. Incubación con anticuerpo secundario (biotinilado): se añade un anticuerpo anti-IgG de conejo obtenido en cerdo biotinilado (*Dako®*, Glostrup, Denmark, E 0353, dilución 1/200) sobre cada preparación y se incuba durante 30' a temperatura ambiente.
10. Lavado IV: se realiza igual que el lavado III.
11. Conjugado con estreptavidina: sobre cada preparación se añade un preparado de estreptavidina conjugada con peroxidasa (*Zymed®* 43-4323, dilución 1/400) y se incuba durante 30 minutos a temperatura ambiente.
12. Lavado V: se realiza igual que el lavado III.
13. Revelado: las preparaciones se sumergen en una solución cromógena que contiene 25g de 3-3' tetracloruro de diaminobencidina (DAB) (*Sigma Chemical Co.®*, D5059) y 100 µl de H₂O₂ en 100 ml de agua destilada, durante 10 minutos.
14. Lavado VI: se lavan las preparaciones con agua corriente durante 5'.

15. Contraste con hematoxilina: las preparaciones se contrastan sumergiéndolas en hematoxilina de Harris durante 3 minutos.
16. Lavado VII: se lavan las preparaciones en agua corriente durante 10'.
17. Deshidratar y montar: se deshidratan las muestras realizando pases rápidos (30''-1' cada uno) en una serie de alcoholes ascendentes (70°, 96°, 100°) y se aclaran en xilol. Por último se montan con el medio DPX (*Surgipath®*) y cubreobjetos.

Se utilizó como control positivo una muestra procedente de una metástasis pulmonar de un hemangiosarcoma de la especie canina, con reactividad comprobada frente al anticuerpo primario empleado.

1.4.3.2. Detección inmunohistoquímica de CD31

El anticuerpo anti-*human* CD31 de las células endoteliales clon: JC70A (*Dako®*, Glostrup, Denmark) es un anticuerpo monoclonal que principalmente marca las células endoteliales y es una herramienta útil para marcar los vasos sanguíneos con el fin de evaluar la angiogénesis en diversos tipos de tumores (Parums *et al.*, 1990; Horak *et al.*, 1992; Toi *et al.*, 1993; Giatromanolaki *et al.*, 1997; Martin *et al.*, 1997; Montrucchio *et al.*, 1998). Para la realización de esta técnica se utilizó un kit especial ultrasensitivo de tinción Estreptavidina-Biotina-Peroxidasa MLINK (MAD-001828QK, *Master Diagnóstica®*).

1. Desparafinar e hidratar: se desparafina en xilol (10') y se hidrata mediante pases (de 5-10') por una serie de alcoholes decrecientes (100°, 96°, 70°). Se lavan las preparaciones en agua destilada (5').
2. Desenmascaramiento antigénico por calor: se someten las preparaciones a un tratamiento con calor en una olla a presión, con 2 l de tampón citrato (10mM, pH=6,0). Cuando se alcanza la presión máxima, se baja la temperatura del fuego y las preparaciones permanecen durante 2 minutos en la olla antes de abrir. Se dejan enfriar en el citrato durante 30' a temperatura ambiente.
3. Lavado I: las preparaciones se lavan 5' en agua destilada y 5' en TBS (buffer, pH=7,4).
4. Inhibición de la peroxidasa endógena: las preparaciones se sumergen en una solución de H₂O₂ (1,5 ml) en metanol (98,5 ml) durante 15'.
5. Lavado II: se realizan dos lavados de 5' cada uno en agua destilada y otros dos (5') en TBS.

6. Bloqueo de uniones inespecíficas: se añade sobre cada preparación un ultrabloqueante (*Master Diagnóstica*®, prediluido listo para uso) y se incuba a temperatura de ambiente durante 10'.
7. Lavado III: se realizan dos lavados de 5' cada uno en TBS.
8. Incubación con anticuerpo primario: se añade el anticuerpo primario y se incuba toda la noche a 4°C en una cámara húmeda. Se empleó el anticuerpo monoclonal de ratón anti-*human* CD31 (clon: JC70A, *Dako*®, Glostrup, Denmark) a una dilución 1/20.
9. Lavado IV: se realizan dos lavados de 5' cada uno en TBS.
10. Incubación con anticuerpo secundario (biotinilado): se añade un anticuerpo multiunión, obtenido en cabra (*Master Diagnóstica*®, anticuerpo prediluido listo para uso) sobre cada preparación y se incuba durante 10' a temperatura de ambiente.
11. Lavado V: se realiza igual que el lavado III.
12. Conjugado con estreptavidina: sobre cada preparación se añade un preparado de estreptavidina conjugada con peroxidasa (*Master Diagnóstica*®, prediluido listo para uso) y se incuba durante 10 minutos a temperatura ambiente.
13. Lavado VI: se realiza igual que el lavado III.
14. Revelado: las preparaciones se sumergen en una solución cromógena que contiene 25g de 3-3' tetracloruro de diaminobencidina (DAB) (*Sigma Chemical Co.*®, D5059) y 100 µl de H₂O₂ en 100 ml de agua destilada, durante 10 minutos.
15. Lavado VII: se lavan las preparaciones con agua corriente durante 5'.
16. Contraste con hematoxilina: las preparaciones se contrastan sumergiéndolas en hematoxilina de Harris durante 3 minutos.
17. Lavado VIII: se lavan las preparaciones en agua corriente durante 10'.
18. Deshidratar y montar: se deshidratan las muestras realizando pases rápidos (30''-1' cada uno) en una serie de alcoholes ascendentes (70°, 96°, 100°) y se aclaran en xilol. Por último se montan con el medio DPX (*Surgipath*®) y cubreobjetos.

Como control positivo se incluyó una muestra de metástasis pulmonar de un hemangiosarcoma canino, con reactividad comprobada frente al anticuerpo primario empleado. Además, como control interno en cada muestra se tuvo en cuenta la tinción de las células endoteliales de los vasos.

1.4.3.3. Detección inmunohistoquímica de CD34

Se empleó el anticuerpo monoclonal anti-*human* CD34 *Class II* clon: QBEnd-10, N°: M 7165 (*Dako*®, Glostrup, Denmark). El CD34 es una proteína que se expresa en las células madre/progenitoras hematopoyéticas inmaduras, en las células endoteliales de los capilares sanguíneos, en los fibroblastos embrionarios y en las células gliales atípicas del tejido nervioso (Krause *et al.*, 1996; Nishio *et al.*, 1997).

1. Desparafinar e hidratar: se desparafina en xilol (10') y se hidrata mediante pases (de 5-10') por una serie de alcoholes decrecientes (100°, 96°, 70°). Se lavan las preparaciones en agua destilada (5').
2. Desenmascaramiento antigénico: se someten las preparaciones a un tratamiento enzimático con tripsina al 0,01% (*Sigma*®, 37°C, durante 10').
3. Lavado I: las preparaciones se lavan 1 vez 5' en agua destilada y dos veces 5' en TBS (buffer, pH=7,4).
4. Inhibición de la peroxidasa endógena: las preparaciones se sumergen en una solución de H₂O₂ (1,5 ml) en metanol (98,5 ml) durante 15'.
5. Lavado II: se realizan dos lavados de 5' cada uno en agua destilada y otros dos (5') en TBS.
6. Incubación con anticuerpo primario: se añade el anticuerpo primario y se incuba toda la noche a 4°C en una cámara húmeda. Se empleó el anticuerpo monoclonal de ratón anti-CD34 *Class II* (clon: QBEnd-10, N°: M 7165, *Dako*®, Glostrup, Denmark), a una dilución 1/10.
7. Lavado III: se realizan dos lavados de 5' cada uno en TBS.
8. Incubación con anticuerpo secundario (biotinilado): se añade un anticuerpo anti-IgG de ratón obtenido en caballo (*Vector*®, BA-2000, dilución 1/400) sobre cada preparación y se incuba durante 30' a temperatura de ambiente.
9. Lavado IV: se realiza igual que el lavado III.
10. Conjugado con estreptavidina: sobre cada preparación se añade un preparado de estreptavidina conjugada con peroxidasa (*Zymed*® 43-4323, dilución 1/400) y se incuba durante 30 minutos a temperatura ambiente.
11. Lavado V: se realiza igual que el lavado III.
12. Revelado: las preparaciones se sumergen en una solución cromógena que contiene 25g de 3-3' tetracloruro de diaminobencidina (DAB) (*Sigma Chemical Co.*®, D5059) y 100 µl de H₂O₂ en 100 ml de agua destilada, durante 10 minutos.

13. Lavado VI: se lavan las preparaciones con agua corriente durante 5'.
14. Contraste con hematoxilina: las preparaciones se contrastan sumergiéndolas en hematoxilina de Harris durante 3 minutos.
15. Lavado VII: se lavan las preparaciones en agua corriente durante 10'.
16. Deshidratar y montar: se deshidratan las muestras realizando pases rápidos (30''-1' cada uno) en una serie de alcoholes ascendentes (70°, 96°, 100°) y se aclaran en xilol. Por último se montan con el medio DPX (*Surgipath*®) y cubreobjetos.

Como control positivo se incluyó una muestra de tejido perteneciente a una metástasis pulmonar de un hemangiosarcoma canino, que presentaba reactividad comprobada frente al anticuerpo primario empleado.

1.4.3.4. Detección inmunohistoquímica de la molécula D2-40

El anticuerpo monoclonal D2-40 (Cat Num: SIG-3730, *SIGNET*®) es un marcador de células endoteliales linfáticas humanas. Este anticuerpo es muy sensible y específico en la detección de vasos linfáticos en muchos tejidos humanos (Evangelou *et al.*, 2005) y especialmente en los tumores mamarios (Choi *et al.*, 2005; Van der Auwera *et al.*, 2005; Marinho *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2008).

1. Desparafinar e hidratar: se desparafina en xilol (10') y se hidrata mediante pases (de 5-10') por una serie de alcoholes decrecientes (100°, 96°, 70°). Se lavan las preparaciones en agua destilada (5').
2. Desenmascaramiento antigénico por calor: se someten las preparaciones a un tratamiento con calor en una olla a presión, con 2 l de tampón citrato (10mM, pH=6,0). Cuando se alcanza la presión máxima, se baja la temperatura del fuego y las preparaciones permanecen durante 2 minutos en la olla antes de abrir. Se dejan enfriar en el citrato durante 30' a temperatura ambiente.
3. Lavado I: las preparaciones se lavan 5' en agua destilada y 5' en TBS (buffer, pH=7,4).
4. Inhibición de la peroxidasa endógena: las preparaciones se sumergen en una solución de H₂O₂ (1,5 ml) en metanol (98,5 ml) durante 15'.
5. Lavado II: se realizan dos lavados de 5' cada uno en agua destilada y otros dos (5') en TBS.

6. Incubación con anticuerpo primario: se añade el anticuerpo primario y se incuba toda la noche a 4°C en una cámara húmeda. Se empleó el anticuerpo monoclonal de ratón D2-40 (Cat Num: SIG-3730, *SIGNET*®), a una dilución 1/40.
7. Lavado III: se realizan dos lavados de 5' cada uno en TBS.
8. Incubación con anticuerpo secundario (biotinilado): se añade un anticuerpo anti-IgG de ratón obtenido en caballo (*Vector*®, BA-2000, dilución 1/400) sobre cada preparación y se incuba durante 30' a temperatura de ambiente.
9. Lavado IV: se realiza igual que el lavado III.
10. Conjugado con estreptavidina: sobre cada preparación se añade un preparado de estreptavidina conjugada con peroxidasa (*Zymed*® 43-4323, dilución 1/400) y se incuba durante 30 minutos a temperatura ambiente.
11. Lavado V: se realiza igual que el lavado III.
12. Revelado: las preparaciones se sumergen en una solución cromógena que contiene 25g de 3-3' tetracloruro de diaminobencidina (DAB) (*Sigma Chemical Co.*®, D5059) y 100 µl de H₂O₂ en 100 ml de agua destilada, durante 10 minutos.
13. Lavado VI: se lavan las preparaciones con agua corriente durante 5'.
14. Contraste con hematoxilina: las preparaciones se contrastan sumergiéndolas en hematoxilina de Harris durante 3 minutos.
15. Lavado VII: se lavan las preparaciones en agua corriente durante 10'.
16. Deshidratar y montar: se deshidratan las muestras realizando pases rápidos (30''-1' cada uno) en una serie de alcoholes ascendentes (70°, 96°, 100°) y se aclaran en xilol. Por último se montan con el medio DPX (*Surgipath*®) y cubreobjetos.

Como control positivo se utilizó un tumor carcinoma mamario no-CI de mujer, que presentaba abundantes vasos linfáticos a la observación de la H-E. Además, en cada una de las preparaciones se realizó un control interno mediante la observación de la tinción de células endoteliales linfáticas.

1.4.3.5. Valoración de la inmunotinción del Factor von Willebrand, CD31, CD34 y de la molécula D2-40

Se realizó mediante la observación de las tinciones descritas, por dos observadores que desconocían la clasificación histológica de los tejidos en el momento de la valoración. La inmunotinción fue considerada positiva cuando el citoplasma de las células se encontraba teñido, como especificaban las casas comerciales. Se valoró la tinción de las células

neoplásicas y/o del estroma. Para cada anticuerpo, se valoró la presencia o ausencia de inmunoeexpresión, estableciendo cada caso como positivo o negativo al marcador correspondiente. La intensidad de inmunoeexpresión se clasificó como 0= negativa, 1= leve, 2= moderada, 3= fuerte.

Asimismo, para cada marcador se evaluó la tinción de células endoteliales sanguíneas, linfáticas o ambas y si este marcaje era regular (tinción de todos los vasos presentes en el tejido) o irregular (no se tiñeron todos los vasos presentes en la muestra tisular).

1.4.4. Estudio inmunohistoquímico de VEGF-A, VEGF-D y VEGFR-3

Se realizó el estudio inmunohistoquímico de varios factores de crecimiento vascular pertenecientes a la familia de VEGF (VEGF-A, VEGF-D) y del receptor 3 del factor de crecimiento de VEGF (VEGFR-3), en las muestras de tejido de los tumores mamarios caninos CI (n=22), TMM no-CI (n=20) y en la MN (n=4), para caracterizar la expresión de dichos factores y del receptor 3 en las células epiteliales de dichas muestras.

1.4.4.1. Detección inmunohistoquímica de VEGF-A

A continuación se describen los pasos empleados.

1. Desparafinar e hidratar: se desparafina en xilol (10') y se hidrata mediante pases (de 5-10') por una serie de alcoholes decrecientes (100°, 96°, 70°). Se lavan las preparaciones en agua destilada (5').
2. Desenmascaramiento antigénico por calor: se someten las preparaciones a un tratamiento con calor en una olla a presión, con 2 l de tampón citrato (10mM, pH=6,0). Cuando se alcanza la presión máxima, se baja la temperatura del fuego y las preparaciones permanecen durante 2 minutos en la olla antes de abrir. Se dejan enfriar en el citrato durante 30' a temperatura ambiente.
3. Lavado I: las preparaciones se lavan 5' en agua destilada y 5' en TBS (buffer, pH=7,4).
4. Inhibición de la peroxidasa endógena: las preparaciones se sumergen en una solución de H₂O₂ (1,5 ml) en metanol (98,5 ml) durante 15'.
5. Lavado II: se realizan dos lavados de 5' cada uno en agua destilada y otros dos (5') en TBS.

6. Bloqueo de uniones inespecíficas: se añade sobre cada preparación un ultrabloqueante (*Master Diagnóstica*®, prediluido listo para uso) y se incuba a temperatura de ambiente durante 10'.
7. Lavado III: se realizan dos lavados de 5' cada uno en TBS.
8. Incubación con anticuerpo primario: se añade el anticuerpo primario y se incuba toda la noche a 4°C en una cámara húmeda. Se empleó el anticuerpo policlonal de conejo anti-VEGF-A (clon: A-20: sc-152, *Santa Cruz Biotechnology*®, Inc.), a una dilución 1/500.
9. Lavado IV: se realizan dos lavados de 5' cada uno en TBS.
10. Incubación con anticuerpo secundario (biotinilado): se añade un anticuerpo anti-IgG de conejo obtenido en cerdo biotinilado (*Dako*®, Glostrup, Denmark, E 0353, dilución 1/200) sobre cada preparación y se incuba durante 30' a temperatura ambiente.
11. Lavado V: se realiza igual que el lavado III.
12. Conjugado con estreptavidina: sobre cada preparación se añade un preparado de estreptavidina conjugada con peroxidasa (*Zymed*® 43-4323, dilución 1/400) y se incuba durante 30 minutos a temperatura ambiente.
13. Lavado VI: se realiza igual que el lavado III.
14. Revelado: las preparaciones se sumergen en una solución cromógena que contiene 25g de 3-3' tetracloruro de diaminobencidina (DAB) (*Sigma Chemical Co.*®, D5059) y 100 µl de H₂O₂ en 100 ml de agua destilada, durante 10 minutos.
15. Lavado VII: se lavan las preparaciones con agua corriente durante 5'.
16. Contraste con hematoxilina: las preparaciones se contrastan sumergiéndolas en hematoxilina de Harris durante 3 minutos.
17. Lavado VIII: se lavan las preparaciones en agua corriente durante 10'.
18. Deshidratar y montar: se deshidratan las muestras realizando pases rápidos (30''-1' cada uno) en una serie de alcoholes ascendentes (70°, 96°, 100°) y se aclaran en xilol. Por último se montan con el medio DPX (*Surgipath*®) y cubreobjetos.

El control positivo incluido para la validación de esta técnica fue un hemangiosarcoma canino, que mostró reactividad frente al anticuerpo primario.

1.4.4.2.Detección inmunohistoquímica de VEGF-D

Los pasos del 1-5 y del 10-18 son iguales a los descritos en el apartado 1.4.4.1.

6. Bloqueo de uniones inespecíficas: se añade sobre cada preparación suero normal de cabra (*Dako®*, Glostrup, Denmark, X0907, dilución 1/25) y se incuba a temperatura de ambiente durante 30'.
7. Incubación con anticuerpo primario: se añade el anticuerpo primario toda la noche a 4°C en una cámara húmeda. Se empleó el anticuerpo policlonal de conejo VEGF-D (clon H-144: sc-13085, *Santa Cruz Biotechnology®*, Inc.).
8. Lavado III: se realizan dos lavados de 5' cada uno en TBS.
9. Incubación con anticuerpo secundario (biotinilado): se añade un anticuerpo anti-IgG de conejo obtenido en cabra biotinilado (*Dako®*, Glostrup, Denmark, E0432, dilución 1/300) sobre cada preparación y se incuba durante 30' a temperatura ambiente.

Como control positivo, se incluyó una muestra de mama normal.

1.4.4.3.Detección inmunohistoquímica de VEGFR-3

A continuación se describen los pasos empleados.

1. Desparafinar e hidratar: se desparafina en xilol (10') y se hidrata mediante pases (de 5-10') por una serie de alcoholes decrecientes (100°, 96°, 70°). Se lavan las preparaciones en agua destilada (5').
2. Desenmascaramiento antigénico con tripsina y calor: se someten las preparaciones a un tratamiento enzimático con tripsina al 0,01% (*Sigma®*, 37°C, durante 10'). Una vez transcurrido el tiempo, se lavan las preparaciones dos veces (5') en TBS (buffer, pH=7,4). Seguidamente las preparaciones se someten a un tratamiento con calor en una olla a presión, con 2 l de tampón citrato (10mM, pH=6,0). Cuando se alcanza la presión máxima, se baja la temperatura del fuego y las preparaciones permanecen durante 2 minutos en la olla antes de abrir. Se dejan enfriar en el citrato durante 30' a temperatura ambiente.
3. Lavado I: las preparaciones se lavan 5' en agua destilada y 5' en TBS

4. Inhibición de la peroxidasa endógena: las preparaciones se sumergen en una solución de H_2O_2 (1,5 ml) en metanol (98,5 ml) durante 15'.
5. Lavado II: se realizan dos lavados de 5' cada uno en agua destilada y otros dos (5') en TBS.
6. Bloqueo de uniones inespecíficas: se añade sobre cada preparación suero normal de cabra (*Dako®*, Glostrup, Denmark, X0907, dilución 1/25) y se incuba a temperatura de ambiente durante 30'.
7. Incubación con anticuerpo primario: tras retirar el suero normal, se añade el anticuerpo primario y se incuba toda la noche a 4°C en una cámara húmeda. Se empleó el anticuerpo policlonal de conejo anti-FLT-4/VEGFR-3 (clon: FLT-4 IgG # 1 (*Affinity pure*), *Alpha Diagnostic International®*), a una dilución 1/200.
8. Lavado III: se realizan dos lavados de 5' cada uno en TBS.
9. Incubación con anticuerpo secundario (biotinilado): se añade un anticuerpo multiunión, obtenido en cabra (*Master Diagnóstica®*, anticuerpo prediluido listo para uso) sobre cada preparación y se incuba durante 10' a temperatura de ambiente.
10. Lavado IV: se realiza igual que el lavado III.
11. Conjugado con estreptavidina: sobre cada preparación se añade un preparado de estreptavidina conjugada con peroxidasa (*Master Diagnóstica®*, prediluido listo para uso) y se incuba durante 10 minutos a temperatura ambiente.
12. Lavado V: se realiza igual que el lavado III.
13. Revelado: las preparaciones se sumergen en una solución cromógena que contiene 25g de 3-3' tetracloruro de diaminobencidina (DAB) (*Sigma Chemical Co.®*, D5059) y 100 μ l de H_2O_2 en 100 ml de agua destilada, durante 10 minutos.
14. Lavado VI: se lavan las preparaciones con agua corriente durante 5'.
15. Contraste con hematoxilina: las preparaciones se contrastan sumergiéndolas en hematoxilina de Harris durante 3 minutos.
16. Lavado VII: se lavan las preparaciones en agua corriente durante 10'.
17. Deshidratar y montar: se deshidratan las muestras realizando pases rápidos (30''-1' cada uno) en una serie de alcoholes ascendentes (70°, 96°, 100°) y se aclaran en xilol. Por último se montan con el medio DPX (*Surgipath®*) y cubreobjetos.

Se utilizó como control positivo una muestra de carcinoma mamario no-CI de mujer con abundantes vasos linfáticos con reactividad conocida frente al anticuerpo primario empleado.

1.4.4.4. Valoración de la inmunotinción de VEGF-A, VEGF-D y VEGFR-3

La valoración de la inmunotinción de dichas técnicas se realizó, en todos los casos, por dos observadores que desconocían la clasificación histológica de los tejidos en el momento de la valoración. La tinción se consideró positiva cuando aparecía en el citoplasma de las células, como especificaban las casas comerciales. Para cada anticuerpo se valoró la presencia o ausencia de inmunoexpresión en las células tumorales y se determinó la intensidad de la tinción como 0= negativa, 1= ligera, 2= moderada, 3= fuerte.

Por otro lado, se evaluó el anticuerpo VEGFR-3 como marcador de vasos linfáticos, teniendo en cuenta la tinción de todos los vasos linfáticos presentes en el tejido.

1.4.5. Estudio inmunohistoquímico de COX-2

Los pasos del 1-7 y del 11-18 son iguales a los descritos en el apartado **1.4.4.1**.

- 8.** Incubación con anticuerpo primario: se añade el anticuerpo primario y se incuba toda la noche a 4°C en una cámara húmeda. Se empleó el anticuerpo policlonal de cabra anti-COX-2 (clon: N-20: sc-1746, *Santa Cruz Biotechnology®*, Inc.), a una dilución 1/150.
- 9.** Lavado IV: se realizan dos lavados de 5' cada uno en TBS.
- 10.** Incubación con anticuerpo secundario (biotinilado): se añade un anticuerpo biotinilado anti-IgG de cabra obtenido en ratón (*Immunopure®*, N. 31732, dilución 1/200) sobre cada preparación y se incuba durante 30' a temperatura ambiente.

Para la validación de la técnica se utilizó como control positivo un tumor mamario canino con reactividad conocida frente al anticuerpo primario.

1.4.5.1. Valoración de la inmunotinción de COX-2

La valoración de la inmunotinción fue llevada a cabo por dos observadores. Se valoró la presencia o ausencia de inmunoexpresión en el citoplasma de las células neoplásicas. Dada la heterogeneidad de la tinción de COX-2, el criterio adoptado se basó en el

porcentaje de células inmunoreactivas, en combinación con la estimación de la intensidad de la tinción en las mismas. Así los tumores se clasificaron en:

- 0= **Negativo**: no existen células positivas a la tinción.
- 1= **Positivo leve**: ligera tinción difusa en el citoplasma en el 75 a 100% de las células (puede contener tinción fuerte en menos del 10% de las células).
- 2= **Positivo moderado**: tinción moderada en el 50 a 100% de las células; tinción ligera en el 75 a 100% de las células con grupos de entre 10 y 50% de las células con tinción fuerte, o cuando aparecen sólo grupos de tinción fuerte en el 10 a 50% de las células.
- 3= **Positivo fuerte**: tinción fuerte en más del 50% de las células.

1.4.6. Estudio inmunohistoquímico de proliferación tumoral (índice de Ki-67)

Para determinar el índice (%) de proliferación celular en las muestras tumorales (n=42) y en la MN (n=4) se llevó a cabo la detección inmunohistoquímica del marcador de proliferación celular Ki-67, siguiendo los pasos que se detallan a continuación.

1. Desparafinar e hidratar: se desparafina en xilol (10') y se hidrata mediante pases (de 5-10') por una serie de alcoholes decrecientes (100°, 96°, 70°). Se lavan las preparaciones en agua destilada (5').
2. Desenmascaramiento antigénico por calor: se someten las preparaciones a un tratamiento con calor en una olla a presión, con 2 l de tampón citrato (10mM, pH=6,0). Cuando se alcanza la presión máxima, se baja la temperatura del fuego y las preparaciones permanecen durante 2 minutos en la olla antes de abrir. Se dejan enfriar en el citrato durante 30' a temperatura ambiente.
3. Lavado I: las preparaciones se lavan 5' en agua destilada y 5' en TBS (buffer, pH=7,4).
4. Incubación con anticuerpo primario: se añade el anticuerpo primario y se incuba durante 1 hora a temperatura ambiente en una cámara húmeda. Se empleó el anticuerpo monoclonal de ratón anti-ki-67 (clon: MIB-1; *Master Diagnóstica*®), a una dilución 1/50.
5. Lavado II: se realizan dos lavados de 5' cada uno en TBS.

6. Incubación con anticuerpo secundario (biotinilado): se añade un anticuerpo anti-IgG de ratón obtenido en caballo (*Vector®*, BA-2000, dilución 1/400) sobre cada preparación y se incuba durante 30' a temperatura de ambiente.
7. Lavado III: se realiza igual que el lavado III.
8. Conjugado con estreptavidina: sobre cada preparación se añade un preparado de estreptavidina conjugada con peroxidasa (*Zymed®* 43-4323, dilución 1/400) y se incuba durante 30 minutos a temperatura ambiente.
9. Lavado IV: se realiza igual que el lavado III.
10. Revelado: las preparaciones se sumergen en una solución cromógena que contiene 25g de 3-3' tetracloruro de diaminobencidina (DAB) (*Sigma Chemical Co.®*, D5059) y 100 µl de H₂O₂ en 100 ml de agua destilada, durante 10 minutos.
11. Lavado V: se lavan las preparaciones con agua corriente durante 5'.
12. Contraste con hematoxilina: las preparaciones se contrastan sumergiéndolas en hematoxilina de Harris durante 3 minutos.
13. Lavado VI: se lavan las preparaciones en agua corriente durante 10'.
14. Deshidratar y montar: se deshidratan las muestras realizando pases rápidos (30''-1' cada uno) en una serie de alcoholes ascendentes (70°, 96°, 100°) y se aclaran en xilol. Por último se montan con el medio DPX (*Surgipath®*) y cubreobjetos.

Como control positivo interno se empleó la existencia de positividad en las mitosis presentes en las muestras empleadas.

1.4.6.1. Valoración de la inmunotinción. Índice de proliferación celular

La valoración de la inmunotinción del marcador Ki-67 fue llevada a cabo por dos observadores que desconocían la clasificación histológica de los tejidos en el momento de la observación. Se consideró que la tinción era positiva cuando ésta aparecía en el núcleo de las células independientemente de la intensidad.

Para determinar el índice de proliferación celular de cada tejido (% Ki-67), se realizó un conteo de los núcleos positivos y negativos de las células tumorales (CI, TMM no-CI) y de las células de la glándula mamaria (MN) presentes en 5 campos representativos (a 40X) de cada uno de los tejidos estudiados. Los campos seleccionados se correspondieron con áreas que mostraron la positividad más elevada y homogénea, evitando las áreas de necrosis y zonas de inflamación. El índice de Ki-67 fue determinado en 5 campos de cada muestra, contando al menos 1000 células por tumor. Con esos datos se obtuvo el

porcentaje medio de células positivas a Ki-67 (porcentaje de células en proliferación). Los núcleos teñidos de fibroblastos y las células endoteliales e inflamatorias, no fueron considerados para el conteo.

1.5. Estudio de densidad y proliferación vascular

Para evaluar la cantidad de vasos presentes en los diferentes tipos de tumores de mama (CI y TMM no-CI) y relacionar este dato con la malignidad tumoral y la capacidad de los mismos para producir metástasis a distancia, se estableció la densidad microvascular (DMV) en todas las muestras del estudio, incluida la mama normal.

Por otro lado, se determinó el índice de proliferación de vasos linfáticos para evaluar la capacidad de formación de nuevos vasos linfáticos por parte de los diferentes tipos tumorales (CI y TMM no-CI) y comparar éstos con la mama normal.

1.5.1. Estudio de densidad microvascular (DMV)

Se llevó a cabo el conteo del número de microvasos (vasos sanguíneos y linfáticos) presentes en cada una de las muestras incluidas en el estudio (CI, TMM no-CI y MN). Para detectar dichos vasos, éstos fueron marcados mediante técnica inmunohistoquímica utilizando el marcador de células endoteliales CD31. La cuantificación fue realizada por dos observadores independientemente. Se llevó a cabo la observación de toda la muestra y se seleccionaron aquellas zonas de mayor número de vasos que presentaban la positividad más elevada y homogénea. El valor de la densidad microvascular (DMV) se estableció en cada muestra como el valor medio de microvasos en 10 campos a 40X. Los vasos que se incluyeron para el conteo estuvieron formados por un número de células endoteliales variable entre 1 a 25, los vasos que tenían pared muscular y/o más de 25 células endoteliales fueron excluidos del conteo.

1.5.2. Estudio de proliferación de vasos linfáticos (LV Ki-67 índice)

Se determinó el índice de proliferación de vasos linfáticos en cada una de las muestras tisulares incluidas en el estudio (CI, TMM no-CI y MN). Para determinar el porcentaje de proliferación de vasos linfáticos (LV Ki-67 índice), se utilizó el marcador de proliferación celular Ki-67. Los vasos linfáticos se detectaron a partir de su morfología. El conteo fue realizado por dos observadores que no conocían el diagnóstico histológico del tejido en el momento del conteo. Se tuvieron en cuenta vasos linfáticos de diferentes tamaños de manera que el número de células endoteliales linfáticas de cada vaso varió entre 1 a 25

células. Se contaron 100 células endoteliales linfáticas tanto positivas como negativas al marcador Ki-67, en cada uno de los tejidos, y se determinó el porcentaje de positividad (proliferación) para cada caso.

1.6. Estudio de microscopía electrónica de transmisión

1.6.1. Muestras para microscopía electrónica

Se ha realizado un estudio ultraestructural de muestras de 5 carcinomas inflamatorios mamarios caninos seleccionadas, fijadas en formol tamponado al 10%. En todas las muestras seleccionadas se había observado, mediante H-E, el fenómeno de mimetismo vascular (ELCs). Las muestras seleccionadas fueron **CI 1, CI 3, CI 9, CI 13 y CI 17**.

1.6.2. Procesado de muestras para microscopía electrónica

Antes de comenzar el procesado para la inclusión de los tejidos en las resinas apropiadas para el estudio ultraestructural, las muestras fijadas en formol tamponado al 10% permanecieron 24 horas en PBS a 4°C para eliminar los restos de formol.

Tras el lavado, las muestras se sumergieron en una solución de osmio al 1% diluido en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras lavar de nuevo con PBS, se sometieron a una serie de acetonas de grado creciente (30°, 50°, 70°, 80° y dos pases por acetona de 100°), permaneciendo 15' en cada una. Gradualmente se fueron infiltrando las muestras con una mezcla de resinas Müllenhauer (25%, 50%, 75%, 100% diluida en acetona de 100°), permaneciendo una noche en cada pase. Finalmente se solidificaron en bloque en una estufa a 60° C durante 24 horas.

En el Centro de Microscopía Electrónica de la UCM se cortaron los bloques con un ultramicrotomo *Ultracut E Reichert-Jung®* y se obtuvieron cortes semifinos (0,5 µm) de cada muestra que se tiñeron con azul de metileno de Richardson para la identificación del área a estudiar. Se seleccionaron zonas de carcinoma inflamatorio mamario en las que se apreciaban células tumorales que podrían estar formando estructuras vasculares, como las que se producen en el fenómeno de mimetismo vascular. Las zonas objeto de estudio se tallaron de nuevo y se cortaron a 60 nm para introducirlas en una rejilla y visualizarlas al microscopio electrónico Geol. 1010, conectado a una cámara digital *Megaview II Sofá Imaging System®* y a un ordenador que permitía obtener fotografías digitales con el programa *Sofá Imaging Analysis®*.

2. ESTUDIO DE PATRÓN DE METÁSTASIS

2.1. Animales

Partiendo de la hipótesis propuesta por nuestro grupo, que plantea que el CI mamario canino podría metastatizar a órganos diferentes a los que habitualmente lo hacen el resto de tumores mamarios malignos (TMM) caninos no-CI, se ha realizado un estudio que incluyó 72 perras con tumores mamarios malignos metastásicos divididas en 2 grupos: CI mamario canino (n=39) y TMM no-CI (n=33), atendidas en la consulta de Oncología Mamaria del HCV de la Facultad de Veterinaria de la UCM entre los años 1995-2005 y necropsiadas en el servicio de Anatomía Patológica del HCV, siguiendo el protocolo establecido. En estos grupos se han incluido los casos de CI mamario (n=22) y de TMM no-CI (n=20) utilizados en el estudio de inmunofenotipo y angiogénesis y se ha incrementado el número de casos para poder tener una mayor muestra. Los grupos estuvieron constituidos de la siguiente manera.

Grupo CI: Incluyó 39 perras con edades comprendidas entre los 7 y 15 años de edad (media \pm SD, 10.68 \pm 2.09). Las razas representadas fueron Mestizo (n=9), Pastor Alemán (n=6), Caniche (n=3), Cocker Spaniel (n=2), Pointer (n=2) y Doberman (n=2) y Bóxer, Mastín, Husky Siberiano, Pastor Aragonés, Border Collie, Bichón Maltés, Samoyedo, Bobtail, Basset Artesien Norma, Perro de aguas, Fox Terrier, Pequinés, Rottweiler, West Highland White Terrier (n=1, para cada raza). Dentro de éste grupo se encuentran las 22 perras con CI mamario incluidas en los estudios de inmunofenotipo y angiogénesis.

Grupo TMM no-CI: Incluyó 33 perras con edades comprendidas entre los 3 y los 16 años (media \pm SD, 11 \pm 3.64). Las razas representadas fueron Mestizo (n=13), Cocker Spaniel (n=5) y Pastor Alemán (n=5), Caniche (n=3), Yorkshire Terrier, Pastor Belga, Mastín, Teckel, Rottweiler, Husky Siberiano, Bretón Español (n=1, para cada raza). Dentro de éste grupo se encuentran los 20 casos de TMM no-CI incluidos en los estudios de inmunofenotipo y angiogénesis.

En todos los casos se obtuvieron los datos macroscópicos de las necropsias y se confirmaron los sitios de metástasis mediante histopatología.

2.2. Muestras de tumores mamarios y metástasis

En cada uno de los casos (n=72) se realizó una necropsia ordenada, sistemática y completa y una toma de muestras. En todos los casos se obtuvieron muestras representativas, en formol tamponado al 10%, de los tumores mamarios, ganglios regionales, pulmón, corazón, bazo, hígado, riñón, vejiga de la orina, páncreas, glándulas adrenales, aparato reproductor (ovario, útero y vagina), cerebro, hueso y músculo; para evaluar la presencia de metástasis procedentes del tumor mamario. Por otro lado, también se tomaron muestras de todos los tejidos que, mediante la observación macroscópica, fueran sospechosos de tener metástasis del tumor mamario.

Las muestras procedentes de tumores mamarios se identificaron siguiendo el mismo sistema utilizado para los tumores del estudio de inmunofenotipo y angiogénesis.

2.3. Estudio histopatológico

2.3.1. Procesado de muestras para histopatología

Las muestras de las biopsias y necropsias de los animales incluidos en este estudio, fueron obtenidas y procesadas de la misma manera que se especificó para las muestras del estudio de inmunofenotipo y angiogénesis (apartado 1.3.1).

2.3.2. Diagnóstico histopatológico

Se realizó un estudio histológico de las muestras en H-E de los tumores mamarios caninos en incluidos en el estudio (n= 39 CI, n= 33 CI), obtenidos a partir de la necropsia o de la extirpación quirúrgica. Todos los tumores fueron diagnosticados empleando la clasificación de la OMS para las neoplasias caninas y felinas (Misdorp *et al.*, 1999). Para el diagnóstico de los carcinomas ricos en lípidos, se empleó el criterio empleado para los tumores del estudio de inmunofenotipo y angiogénesis, descrito en el apartado 1.3.2 de material y métodos.

Por otro lado, se revisaron las preparaciones histológicas (H-E) procedentes de las biopsias y necropsias de los animales incluidos en el estudio (CI= 39 animales, TMM no-CI= 33 casos). En todos los casos, se observaron las H-E de los órganos obtenidos de cada animal y se evaluó la presencia o ausencia de metástasis del tumor mamario en cada uno de ellos. Los órganos evaluados en todos los casos fueron: ganglios, pulmón, corazón, bazo,

hígado, riñón, vejiga de la orina, páncreas, glándulas adrenales, aparato reproductor (ovario, útero y vagina), cerebro, hueso y músculo.

Con los datos obtenidos se realizó un análisis estadístico para determinar la posible existencia de diferencias significativas en cuanto al patrón de metástasis entre los dos grupos (CI y TMM no-CI).

3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico fue realizado con el apoyo del Centro de Cálculo de la Universidad Complutense de Madrid, mediante el empleo del programa estadístico SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*, Chicago, IL, USA) versión 15.0 para Windows.

Para el análisis descriptivo de las variables continuas se usó el valor medio, la mediana, la desviación estándar de la media, el mínimo y el máximo. Los resultados fueron expresados en forma de media \pm desviación estándar. En el análisis descriptivo de las variables categóricas se obtuvieron las frecuencias y los porcentajes de las categorías.

Para evaluar las variables continuas entre sí se empleó la prueba de T-Student que compara las medias. La relación existente entre las variables categóricas fue evaluada empleando pruebas paramétricas (cuando las variables siguen distribución normal) como el método de chi-cuadrado (χ^2) de Pearson y la correlación de Pearson ó pruebas no paramétricas (cuando las variables no siguieron una distribución normal) como la correlación Gamma. La relación entre las variables categóricas y las continuas fue estudiada mediante los test de Análisis de la Varianza (ANOVA). En los ANOVAS, después del test F global, que muestra si hay diferencias significativas globalmente entre las medias, se realizó la prueba de Duncan que hace contrastes específicos entre las medias.

Por otro lado, dentro del estudio de inmunofenotipo y angiogénesis, se ha realizado un análisis estadístico multivariante utilizando como variables dependientes LV Ki-67 índice y DMV, para estudiar la influencia del resto de las variables sobre ellas de forma independiente.

Para el estudio de asociaciones estadísticas entre los receptores hormonales y los parámetros de angiogénesis, se han realizado cruces estadísticos entre variables de igual significado (positivo/negativo entre sí y variables de intensidad entre sí).

Las asociaciones fueron consideradas significativas para los valores de $p < 0,05$.

3.1. Análisis estadístico del estudio de inmunofenotipo y angiogénesis

3.1.1. Base de datos

Se empleó una base de datos que incluyó las características clínicas y epidemiológicas del animal, los datos histológicos de los tumores y los resultados de la inmunohistoquímica de los receptores hormonales y factores relacionados con la angiogénesis.

3.1.2. Variables estadísticas

3.1.2.1. Variables clínicas, epidemiológicas e histológicas

El estudio estadístico incluyó los datos de la historia clínica, exploración física y posterior estudio histopatológico de las muestras. En las **Tablas 3 y 4** se describen las variables empleadas en el estudio.

Tabla 3. Variables clínicas y epidemiológicas categóricas y continuas.

| VARIABLES CLÍNICAS Y EPIDEMIOLÓGICAS | CATEGORÍAS |
|--|-------------------------------|
| Estado reproductivo | Entera |
| | Ovariohisterectomizada |
| Tipo de CI | 0= Primario |
| | 1= Secundario |
| | 2= Secundario post-quirúrgico |
| VARIABLES CLÍNICAS Y EPIDEMIOLÓGICAS CONTINUAS | |
| Edad (años) | |
| Peso (kilogramos) | |

Tabla 4. Variables histológicas categóricas y continuas.

| VARIABLES HISTOLÓGICAS | CATEGORÍAS |
|-------------------------|------------|
| Tipo tumor | CI |
| | TMM no-CI |
| Estructuras tipo comedo | Presentes |
| | Ausentes |
| ELCs | Presentes |
| | Ausentes |

3.1.2.2. Variables de receptores hormonales RE α , RE β , RP y RA

El estudio estadístico incluyó los resultados de la valoración de la inmunotinción de los RE α , RE β , RP y RA en los tejidos pertenecientes a 22 CI, 20 TMM no-CI y 4 MN. Las variables categóricas empleadas se muestran en la **Tabla 5**.

Tabla 5. Variables categóricas del estudio de inmunoexpresión de RE α , RE β , RP y RA.

| VARIABLES INMUNOHISTOQUÍMICAS RE α , RE β , RP Y RA | CATEGORÍAS |
|--|---------------------------------|
| Positividad Tumor | Positivo (>10% céls. positivas) |
| | Negativo (<10% céls. positivas) |
| Intensidad de tinción | 0= Tinción Negativa |
| | 1= Tinción Leve |
| | 2= Tinción Moderada |
| | 3= Tinción Fuerte |

3.1.2.3. Variables de parámetros de angiogénesis

3.1.2.3.1. Variables de los marcadores de células endoteliales

El análisis estadístico incluyó los resultados de la inmunotinción de las células neoplásicas y/o mamarias normales de 22 CI, 20 TMM no-CI y 4 MN, para los marcadores de células endoteliales vWF, CD31 y CD34. Las variables categóricas empleadas se resumen en la **Tabla 6**.

Tabla 6. Variables categóricas del estudio de inmunexpresión de vWF, CD31 y CD34.

| VARIABLES INMUNOHISTOQUÍMICAS vWF, CD31 Y CD34 | CATEGORÍAS |
|---|----------------------------|
| Positividad Tumor | Positivo |
| | Negativo |
| Intensidad de tinción | 0= Tinción Negativa |
| | 1= Tinción Leve |
| | 2= Tinción Moderada |
| | 3= Tinción Fuerte |

3.1.2.3.2. Variables de los marcadores VEGF-A, VEGF-D y VEGFR-3

El estudio estadístico incluyó los resultados de la inmunexpresión de los factores VEGF-A, VEGF-D y VEGFR-3 en las células tumorales de los tejidos empleados (CI, TMM no-CI y MN). Las variables categóricas empleadas se resumen en las **Tablas 7 y 8**.

Tabla 7. Variables categóricas inmunohistoquímicas de VEGF-A, VEGF-D.

| VARIABLES INMUNOHISTOQUÍMICAS VEGF-A Y VEGF-D | CATEGORÍAS |
|--|----------------------------|
| Positividad Tumor | Positivo |
| | Negativo |
| Intensidad de tinción | 0= Tinción Negativa |
| | 1= Tinción Leve |
| | 2= Tinción Moderada |
| | 3= Tinción Fuerte |

Tabla 8. Variables categóricas del estudio de inmunexpresión de VEGFR-3.

| VARIABLES INMUNOHISTOQUÍMICAS VEGFR-3 | CATEGORÍAS |
|--|----------------------------|
| Positividad Tumor | Positivo |
| | Negativo |
| Intensidad de tinción | 0= Tinción Negativa |
| | 1= Tinción Leve |
| | 2= Tinción Moderada |

3.1.2.3.3. Variables de la COX -2

En el análisis estadístico se incluyeron los resultados de la valoración IHQ del anticuerpo anti-COX-2. Las variables categóricas empleadas se describen en la **Tabla 9**.

Tabla 9. Variables categóricas inmunohistoquímicas de COX-2.

| VARIABLES INMUNOHISTOQUÍMICAS COX-2 | CATEGORÍAS |
|---|---------------------|
| Positividad Tumor | Positivo |
| | Negativo |
| Intensidad de tinción | 0= Tinción Negativa |
| | 1= Tinción Leve |
| | 2= Tinción Moderada |
| | 3= Tinción Fuerte |

3.1.2.3.4. Variables del índice de Ki-67

En el estudio estadístico se incluyó el valor obtenido mediante el conteo del valor de Ki-67 en los grupos CI, TMM no-CI y MN. La variable continua empleada se resume en las **Tabla 10**.

Tabla 10. Variable continua del estudio de proliferación celular (**Ki-67**).

| VARIABLE PATOLÓGICA Índice Ki-67 |
|-------------------------------------|
| Ki-67 (%) \pm Desviación estándar |

3.1.2.3.5. Variables de densidad microvascular (DMV)

Se valoraron estadísticamente los resultados obtenidos mediante el conteo de microvasos presentes en los tejidos pertenecientes a los diferentes grupos (CI, TMM no-CI y MN). La variable continua empleada se muestra en la **Tabla 11**.

Tabla 11. Variable continua del estudio de densidad microvascular (**DMV**).

| VARIABLE PATOLÓGICA DVM |
|---|
| Media de número de microvasos (DMV) \pm Desviación estándar |

3.1.2.3.6. Variables de la proliferación de vasos linfáticos (LV Ki-67 índice)

En el estudio estadístico se incluyeron los resultados obtenidos de los 15 CI, 17 TMM no-CI y 4 MN. La variable continua empleada se describe en la **Tabla 12**.

Tabla 12. Variable continua del estudio de proliferación de vasos linfáticos LV Ki-67 índice.

| VARIABLE PATOLÓGICA LV Ki-67 índice |
|---|
| LV Ki-67 índice (%) \pm Desviación estándar |

3.2. Análisis estadístico del estudio de patrón de metástasis

3.2.1. Base de datos

Se empleó una base de datos que incluyó los datos de metástasis obtenidos en necropsia y mediante la observación histológica de los tejidos procedentes de diferentes órganos de los animales necropsiados.

3.2.2. Variables estadísticas

Las variables incluidas en el estudio estadístico se resumen en la **Tabla 13**.

Tabla 13. Variables categóricas de patrón de metástasis.

| VARIABLES PATOLÓGICAS | CATEGORÍAS |
|-----------------------|------------|
| Metástasis a ganglios | Si |
| | No |
| Metástasis a pulmón | Si |
| | No |
| Metástasis a corazón | Si |
| | No |
| Metástasis a bazo | Si |
| | No |
| Metástasis a hígado | Si |
| | No |
| Metástasis a riñón | Si |
| | No |

| VARIABLES PATOLÓGICAS | CATEGORÍAS |
|---|------------|
| Metástasis vejiga de la orina | Si |
| | No |
| Metástasis a páncreas | Si |
| | No |
| Metástasis a glándulas adrenales | Si |
| | No |
| Metástasis a ovario | Si |
| | No |
| Metástasis a reproductor (ovario, útero, y/o vagina) | Si |
| | No |
| Metástasis a hueso | Si |
| | No |
| Metástasis a músculo | Si |
| | No |

IV RESULTADOS

IV. RESULTADOS

1. ESTUDIO DE INMUNOFENOTIPO Y DE ANGIOGÉNESIS EN EL CI MAMARIO CANINO

1.1. Evaluación de los datos clínicos y epidemiológicos

Se incluyeron 42 animales divididos en dos grupos: perras con carcinoma inflamatorio (CI) y perras con tumores mamarios no-CI de alto grado de malignidad histológica y metastásicos (TMM no-CI).

1.1.1. Edad

La edad de las perras que presentaron CI varió entre los 7 y 15 años, con una media de $11 \pm 2,11$ y mediana de 11 años. La edad de los casos de TMM no-CI varió entre los 3 y los 16 años, con una media de $11,5 \pm 2,66$ y mediana de 11 años. El estudio estadístico reveló que no existieron diferencias significativas entre ambos grupos (CI y TMM no-CI) con respecto a la edad ($p=0,84$).

1.1.2. Raza

Las razas de los animales incluidos fueron diversas en ambos grupos (CI y TMM no-CI). En el grupo CI se encontraron 13 razas diferentes y en el grupo TMM no-CI 8 razas diferentes. En ambos grupos, las razas Pastor Alemán y mestizas fueron las más frecuentes, siendo un 22,7% de los casos de CI y un 25% de los casos de TMM no-CI. Además, la raza Cocker también representó el 25% de los casos de TMM no-CI. En la **Tabla 1**, se describe la distribución de razas de los animales incluidos. Tanto el CI como los TMM no-CI aparecen con mayor frecuencia en razas puras (CI $n=22$, 77%; TMM no-CI $n=20$, 75%). Los cuatro perros controles fueron de raza Beagle.

Tabla 1. Distribución de CI y TMM no-CI por raza.

| CI (n=22) | | | TMM no-CI (n=20) | | |
|-----------------------------|---|-------|------------------|---|-----|
| Raza | n | % | Raza | n | % |
| Pastor Alemán | 5 | 22,7% | Pastor Alemán | 5 | 25% |
| Mestizo | 5 | 22,7% | Mestizo | 5 | 25% |
| Caniche | 2 | 9,1% | Cocker | 5 | 25% |
| Bóxer | 1 | 4,5% | Pastor Belga | 1 | 5% |
| Mastín | 1 | 4,5% | Mastín | 1 | 5% |
| Doberman | 1 | 4,5% | Caniche | 1 | 5% |
| Bobtail | 1 | 4,5% | Teckel | 1 | 5% |
| Basset Artesien | 1 | 4,5% | Yokshire Terrier | 1 | 5% |
| Perro de aguas | 1 | 4,5% | | | |
| Rottweiler | 1 | 4,5% | | | |
| Pequinés | 1 | 4,5% | | | |
| Fox Terrier | 1 | 4,5% | | | |
| West Highland White Terrier | 1 | 4,5% | | | |

1.1.3. Peso

Los pesos de los animales incluidos en los grupos CI y TMM no-CI fueron muy similares. En el grupo CI el peso de los animales varió entre los 5 y los 45,9 kilogramos con una media de $23,4 \pm 14,5$ y mediana de 26 kilogramos; mientras que en el grupo con TMM no-CI, el peso osciló entre los 4 y los 58,8 kilogramos con una media de $22,7 \pm 15,3$ y mediana de 27 kilogramos. Por tanto, no existieron diferencias estadísticas entre ambos grupos con respecto al peso ($p=0,89$). El peso de las cuatro perras control incluidas varió entre los 9 y los 28 kilogramos, con una media de $14 \pm 9,3$ y una mediana de 9,5 kilogramos.

1.1.4. Estado reproductivo

Teniendo en cuenta que el estado reproductivo fue anotado en el momento de la evaluación clínica del animal, 37 de las 42 (88,1%) perras incluidas estaban enteras. Evaluando este dato por grupos, el 81,8% (18 animales) de las que desarrollaron CI estaban enteras en el momento de la aparición de la neoplasia y el 95% (19 casos) de las que presentaron TMM no-CI no estaban ovariectomizadas en el momento en que esos tumores se diagnosticaron. No existieron diferencias significativas entre los grupos CI y TMM no-CI, con respecto al estado reproductivo.

1.1.5. Estadío tumor-linfonodo-metástasis en la autopsia

Para este estudio hemos empleado la clasificación del estadio clínico basándonos en el sistema tumor-linfonodo-metástasis (*Tumor-Node-Metastasis*, TNM) en el momento de la autopsia (TNMa) (Greene *et al.*, 2002; Singletary *et al.*, 2002; Sobin y Wittekind, 2002). Según esto, los 22 casos de CI y los 20 TMM no-CI se clasificaron dentro del estadio IV (con metástasis a distancia).

1.1.6. Tipo de carcinoma inflamatorio

Los carcinomas inflamatorios que fueron incluidos en el estudio fueron clasificados según su forma de aparición. En 3 de las perras diagnosticadas de CI no fue posible detallar si el CI fue primario o secundario, debido a que los dueños no supieron concretar si la perra había tenido previamente nódulos mamarios no operados en las mamas afectadas por el CI. Esos 3 casos fueron excluidos del análisis estadístico. Por tanto, de los 19 CI clasificados por el tipo de aparición, 10 de ellos (53%) fueron primarios y 9 secundarios (47%). A su vez, dentro de los CI secundarios, 7 casos (78%) fueron post-quirúrgicos y los 2 casos (22%) restantes no post-quirúrgicos. El estudio estadístico demostró que no existía asociación entre la raza ($p=0,89$), edad ($p=0,263$) o peso ($p=0,717$) de las perras afectadas y el desarrollo de CI primario o secundario (**Figura 1**).



Figura 1. CI mamario canino. Apariencia clínica. Tipos de CI: **A)** Primario; **B)** Secundario post quirúrgico.

1.2. Estudio histopatológico

1.2.1. Diagnóstico histopatológico de los tumores

El estudio histopatológico de las 46 muestras confirmó que 22 de las 42 muestras tumorales se correspondieron con CI y las 20 restantes con TMM no-CI. Por último, se confirmó que los 4 tejidos mamarios pertenecientes a perras sanas sin alteraciones mamarias eran mama normal.

Tanto en los carcinomas inflamatorios como en los TMM no-CI incluidos en el estudio se diagnosticaron varios tipos histológicos que se encuentran resumidos en la **Tabla 2**. Estos diagnósticos se han realizado tras el análisis con H-E, Sudán III y la valoración de la inmunotinción de los marcadores tumorales correspondientes. Para el grupo de tumores CI, el tipo histológico predominante fue el carcinoma tubular, que fue diagnosticado en el 31,8% de los casos de CI (n=7 tumores), seguido del carcinoma lipídico (n=5 casos, 22,7%), carcinoma anaplásico (n=3 casos, 13,6%) y del carcinoma papilar (n=2 neoplasias, 9,1%). Con menor frecuencia se diagnosticaron carcinoma túbulo-papilar (n=1, 4,5%), carcinoma tubular-sólido (n=1, 4,5%), carcinoma sólido (n=1, 4,5%), carcinoma de células escamosas (n=1, 4,5%) y sarcoma (n=1, 4,5%). Dentro del grupo TMM no-CI, los tipos histológicos diagnosticados con mayor frecuencia fueron los carcinosarcomas (n=4 casos, 20%) y carcinoma tubular-sólido simple (n=2) o complejo (n=2) (n=4, 20%), seguidos del carcinoma sólido complejo (n=2, 10%), carcinoma anaplásico (n=2, 10%), carcinoma complejo (n=2, 10%), mioepitelioma maligno (n=2, 10%), carcinoma tubular simple (n=1, 10%), carcinoma túbulo-papilar complejo (n=1, 5%), hemangiopericitoma maligno (n=1, 5%) y osteosarcoma (n=1, 5%).

En los CI, las características histopatológicas encontradas fueron similares a las descritas previamente (Susaneck *et al.*, 1983; Pérez-Alenza *et al.*, 2001; Peña *et al.*, 2003). Es destacable el elevado porcentaje de carcinomas ricos en lípidos (**Figura 2**) y la presencia de un epiteliotropismo marcado de las células neoplásicas pertenecientes a estos tipos tumorales. Para los casos de TMM no-CI, las características histopatológicas observadas fueron las que se corresponden con las descritas para cada tipo tumoral (Misdorp *et al.*, 1999).

Tabla 2. Diagnóstico histopatológico de los tumores CI y TMM no-CI y de la MN.

| Tipo y N° de caso | Diagnóstico |
|-------------------|---|
| CI 1 | Carcinoma anaplásico |
| CI 2 | Carcinoma anaplásico |
| CI 3 | Carcinoma anaplásico |
| CI 4 | Carcinoma lipídico |
| CI 5 | Carcinoma papilar |
| CI 6 | Carcinoma túbulo papilar |
| CI 7 | Carcinoma tubular |
| CI 8 | Carcinoma tubular/sólido |
| CI 9 | Carcinoma tubular |
| CI 10 | Carcinoma tubular |
| CI 11 | Carcinoma lipídico |
| CI 12 | Carcinoma tubular |
| CI 13 | Carcinoma papilar |
| CI 14 | Sarcoma |
| CI 15 | Carcinoma tubular |
| CI 16 | Carcinoma de células escamosas |
| CI 17 | Carcinoma rico en lípidos con zona de osificación |
| CI 18 | Carcinoma tubular |
| CI 19 | Carcinoma lipídico |
| CI 20 | Carcinoma tubular simple |
| CI 21 | Carcinoma sólido |
| CI 22 | Carcinoma lipídico |

| Tipo y N° de caso | Diagnóstico |
|-------------------|---|
| TMM 1 | Carcinosarcoma |
| TMM 2 | Carcinosarcoma |
| TMM 3 | Carcinoma sólido (mioepitelioma maligno) |
| TMM 4 | Carcinoma complejo tubular/sólido con diferenciación escamosa |
| TMM 5 | Carcinoma tubular/sólido complejo |
| TMM 6 | Carcinoma sólido complejo |
| TMM 7 | Carcinosarcoma (mioepitelioma maligno) |
| TMM 8 | Carcinoma anaplásico |
| TMM 9 | Carcinoma complejo |
| TMM 10 | Hemangiopericitoma maligno |
| TMM 11 | Carcinoma túbulo-papilar complejo |
| TMM 12 | Carcinoma tubular/sólido |
| TMM 13 | Carcinoma tubular/sólido |
| TMM 14 | Carcinoma tubular |
| TMM 15 | Carcinoma complejo con diferenciación escamosa |
| TMM 16 | Carcinosarcoma |
| TMM 17 | Osteosarcoma |
| TMM 18 | Carcinoma sólido |
| TMM 19 | Carcinosarcoma |
| TMM 20 | Carcinoma anaplásico |
| MN 1 | Mama normal |
| MN 2 | Mama normal |
| MN 3 | Mama normal |
| MN 4 | Mama normal |

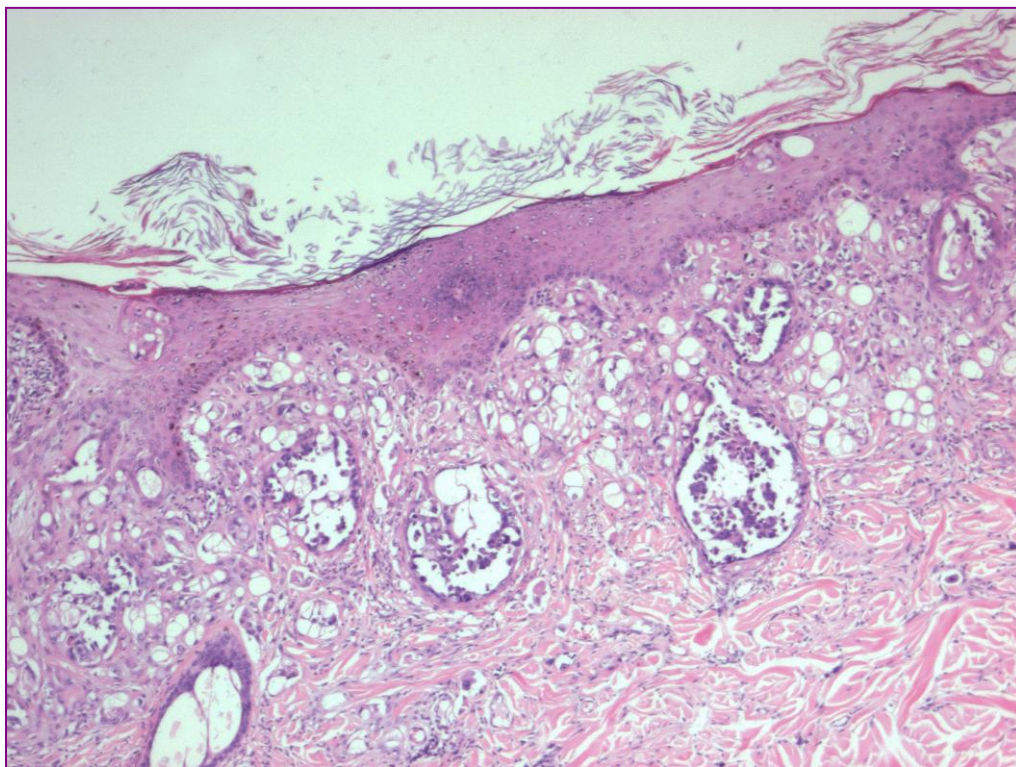


Figura 2. CI mamario canino. Carcinoma rico en lípidos. H-E (x4).

Mediante la evaluación de la H-E, el caso **CI 14** se diagnosticó previamente como un carcinosarcoma; sin embargo, tras la evaluación de las técnicas inmunohistoquímicas de los marcadores de citoqueratinas (pancitoqueratina y 14), vimentina, actina, desmina, Factor von Willebrand (vWF), CD31, CD34 y S-100, dicho caso se re-diagnosticó como un sarcoma (compatible con hemangiosarcoma). En este caso el tumor fue negativo a citoqueratinas (pancitoqueratinas y 14), positivo a vimentina, actina, CD34 y S-100, positivo/negativo a vWF y negativo a CD31 (**Figura 3**).

Asimismo, los casos **TMM 3** y **TMM 7** fueron diagnosticados tras la observación con H-E como carcinoma sólido y carcinosarcoma, respectivamente; sin embargo, una vez evaluada la inmunotinción de los marcadores de estirpe celular, éstos fueron re-diagnosticados como mioepitelioma maligno. La inmunotinción de estos tumores reveló positividad a citoqueratinas (pancitoqueratina y 14), a vimentina y actina y negatividad a desmina. De la misma forma ocurrió con el caso **TMM 10**, que inicialmente se diagnosticó como carcinosarcoma, pero la propia morfología y el estudio inmunohistoquímico de citoqueratina (pancitoqueratina y 14), vimentina, actina, desmina, wVF, CD31, CD34 y S-100 reveló que se trataba de un hemangiopericitoma maligno. En este caso, el tumor fue negativo a citoqueratinas (pancitoqueratina y 14), positivo a vimentina, actina y desmina, positivo a vWF, negativo a CD31 y CD34 y positivo a S-100.

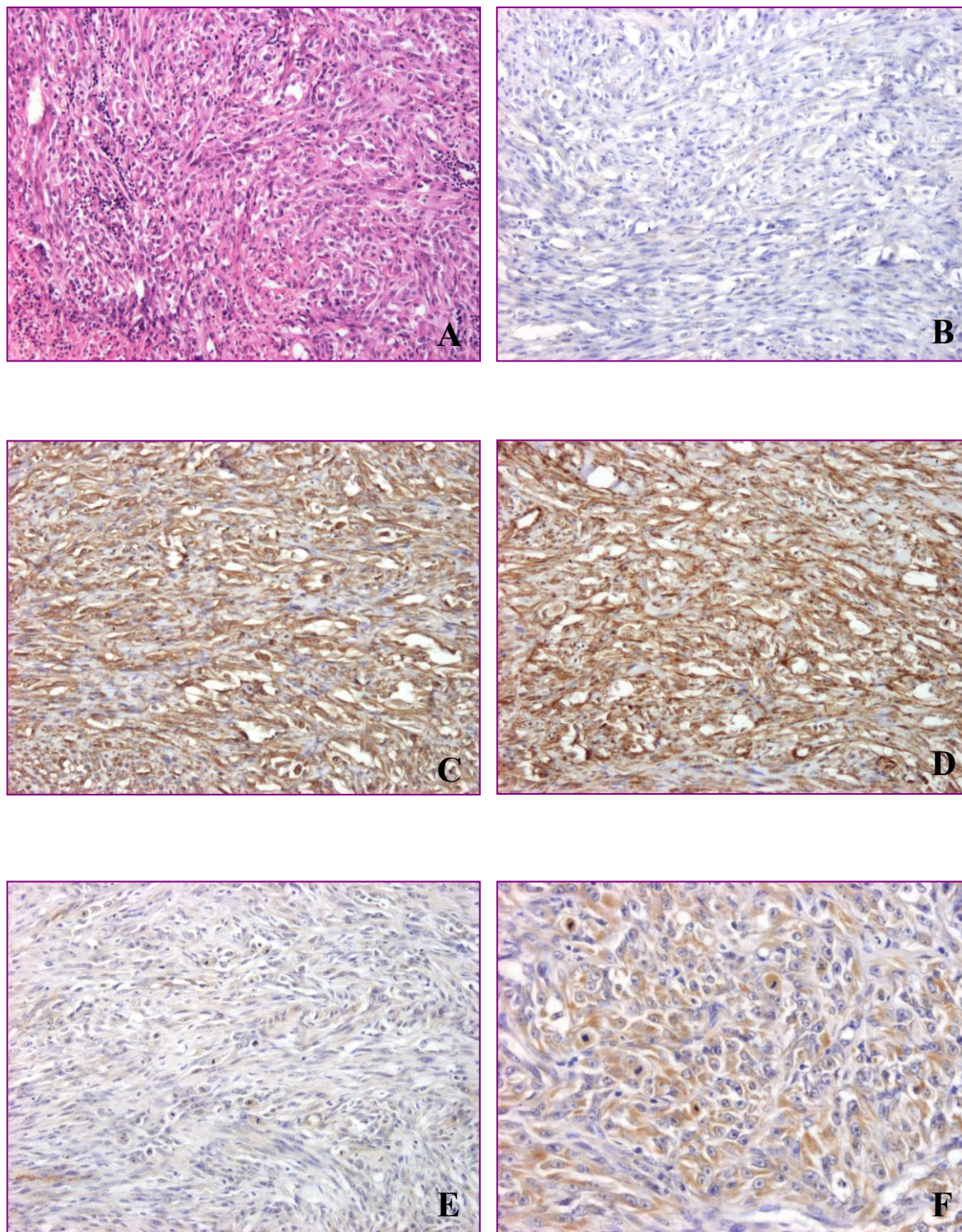


Figura 3. CI mamario canino (CI 14). Sarcoma. Cortes seriados (x20). A) H-E. B), C), D), E) y F) Técnica de estreptavidina-biotina peroxidasa. B) Pancitoqueratina negativo. C) Vimentina positivo. D) Actina positivo. E) vWF positivo/negativo. F) CD34 positivo.

Mediante el estudio histopatológico de la H-E de las muestras procedentes de los tumores de los casos de CI y TMM no-CI, se observó la presencia de émbolos tumorales en el interior de los vasos en todas las muestras tumorales, tanto de los casos CI como en los TMM no-CI, y en los casos de CI se observaron émbolos tumorales en los vasos linfáticos de la dermis superficial en los 22 casos (**Figura 4**).

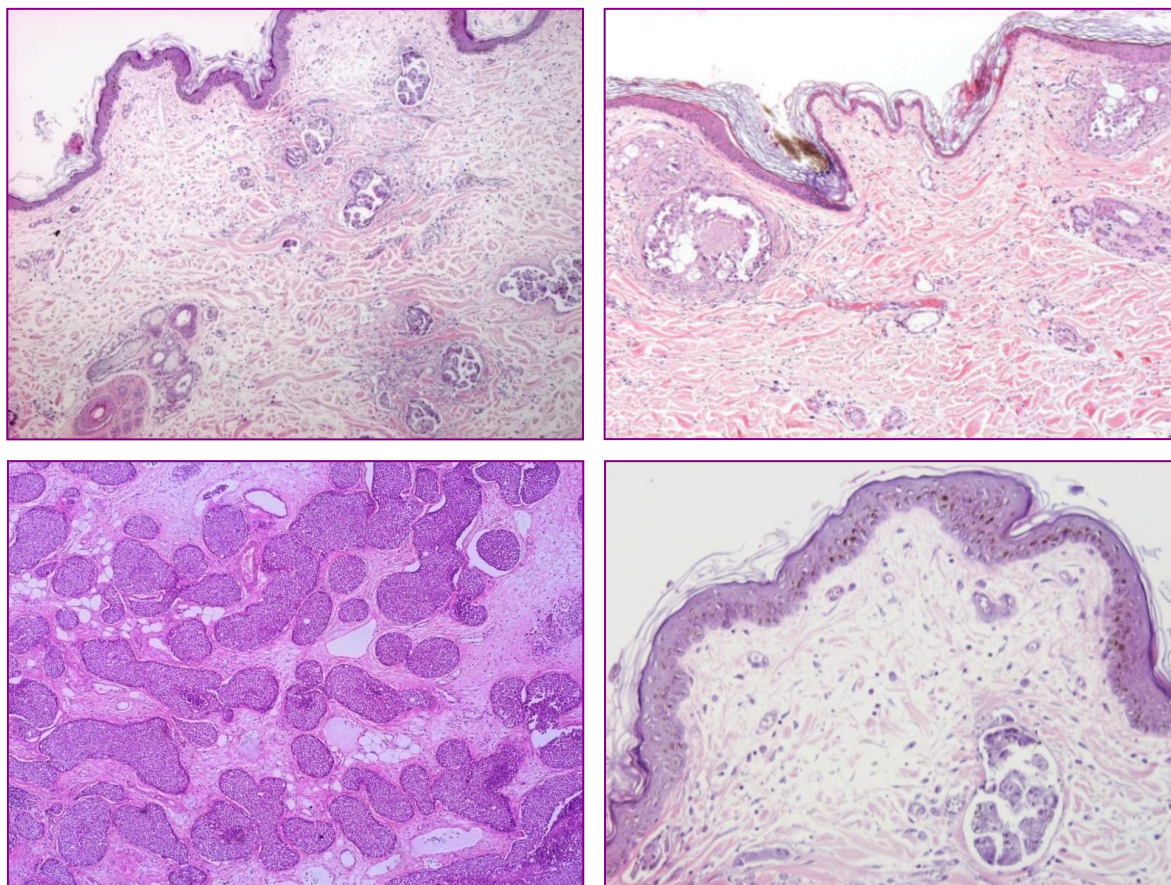


Figura 4. CI mamario canino. Émbolos tumorales en los vasos linfáticos de la dermis superficial. H-E.

1.2.2. Presencia de estructuras tipo comedo

Las estructuras tipo comedo se apreciaron en 8 de los 22 (36,36%) CI estudiados (casos **CI4**, **CI5**, **CI6**, **CI8**, **CI9**, **CI10**, **CI12**, **CI22**); sin embargo, no se localizaron en ninguno de los 20 tejidos procedentes de TMM no-CI incluidos en el estudio. En uno de los 8 (12,5%) tumores (**CI 9**) que presentaron estructuras tipo comedo, también se observaron células tumorales semejantes a endoteliales formadoras de canales de mimetismo vascular (ELCs). Las estructuras tipo comedo son formaciones tumorales con aspecto similar a nidos, que constan de una zona central formada por un acumulo de restos necróticos, rodeados por células tumorales. En ocasiones estas estructuras se ven rodeadas,

a su vez, por una banda de fibrosis. El tamaño y número de las estructuras tipo comedo presentes en un tejido fue variable dentro de un mismo tumor y variable entre tejidos. En general, fue posible observar 1 o 2 estructuras tipo comedo por campo bajo microscopio óptico a 40X. Alrededor de estas estructuras, en la zona de fibrosis, se disponen una cantidad variable de miofibroblastos (detectados mediante inmunohistoquímica) formando círculos concéntricos con respecto al comedocarcinoma (**Figura 4**).

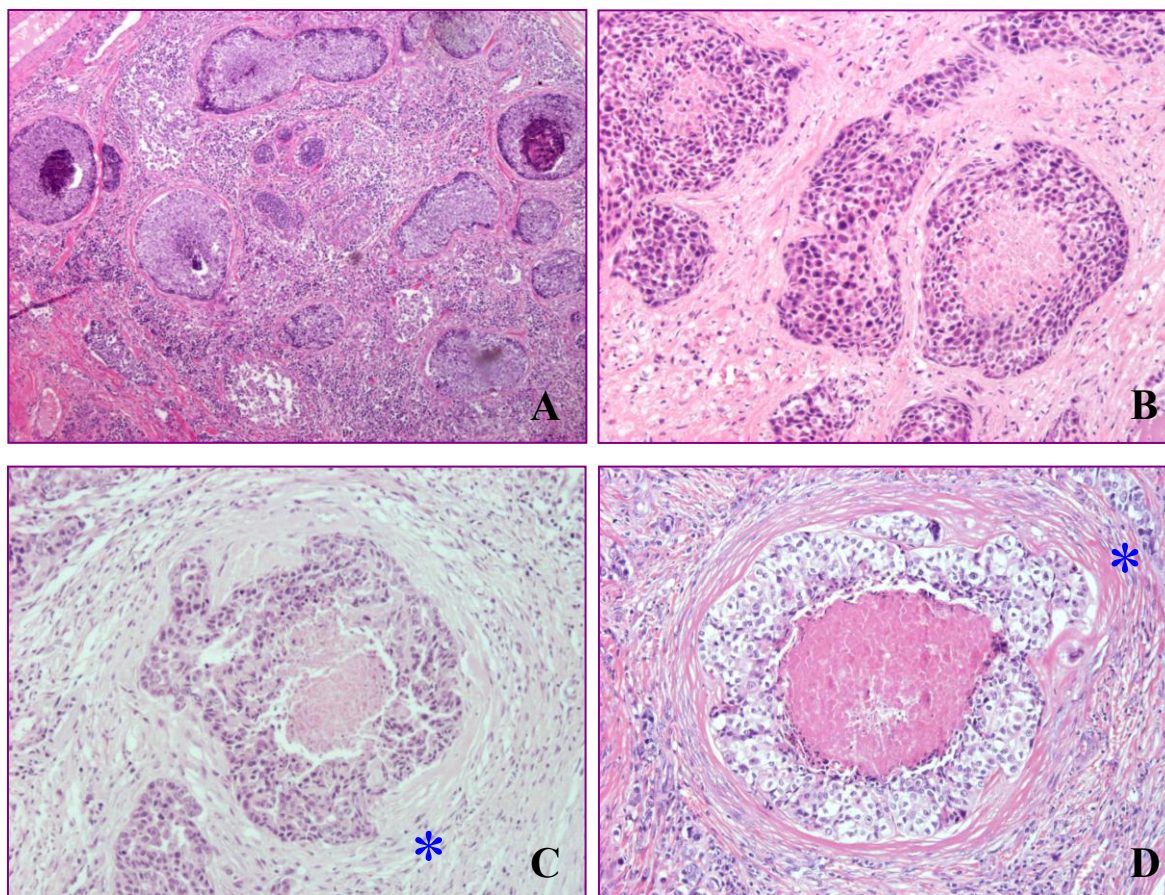


Figura 4. CI mamario canino. Estructuras tipo comedo. H-E. **A)** x4. **B)** x20. **C)** y **D)** Banda de fibrosis (*) rodeando la estructura (x10).

No se encontró relación significativa entre la presencia o ausencia y la intensidad de receptores de hormonas esteroides ($RE\alpha$, $RE\beta$, RP y RA) en los tejidos tumorales, con la aparición de estructuras tipo comedo. Tampoco se encontraron relacionados con la aparición de estas formaciones los factores de crecimiento VEGF-A y VEGF-D, ni los valores del índice Ki-67 o LV Ki-67. Existe asociación inversa entre la presencia de los factores VEGFR-3 ($p=0,035$), COX-2 ($p=0,05$) y el índice de densidad microvascular (DMV) ($p=0,039$) con la presencia de estructuras tipo comedo.

1.2.3. Células tumorales semejantes a endoteliales (ELCs)

Mediante el examen microscópico detallado de la H-E de las muestras pertenecientes a las 42 neoplasias mamarias de este estudio se observó la presencia de células tumorales semejantes a endoteliales (*endotelial like tumoral cells*, ELCs) en 7 de los 22 (31,8%) CI (**CI1, CI3, CI7, CI9, CI13, CI16, CI17**) y en uno de los 20 (5%) TMM no-CI de (**TMM 8**). En el resto de los casos no se localizaron estas estructuras.

En la mayoría de los tumores en los que se observó la presencia de ELCs, estas células se encontraron de forma aislada en el interior de los émbolos tumorales y/o en forma de células infiltrantes altamente malignas dispersas en el estroma, sin localización específica. Ocasionalmente, las ELCs se encontraron formando grupos de células tumorales que dan lugar a estructuras similares a pequeños capilares (mimetismo vascular). En estos casos, el número de células unidas es variable, variando entre 2 a 7 células. Dentro de un mismo tumor fue posible encontrar ELCs aisladas en émbolos tumorales, infiltrando el estroma o formando grupos. En el interior de estos canales formados por las células tumorales, se pueden observar células tumorales, células sanguíneas o restos de células degeneradas (**Figuras 5, 6 y 7**).

Las ELCs aisladas se caracterizan por ser células globosas de contorno nítido y de gran tamaño, miden aproximadamente entre 140-200µm. Presentan marcadas características histológicas de malignidad como anisocariosis, anisocitosis, núcleos gigantes, multinucleación y nucléolos evidentes y la cromatina se dispone de forma laxa por todo el núcleo. El citoplasma es eosinófilo, escaso y se encuentra elongado para dar lugar a la oquedad que asemeja un canal vascular. Su característica diferencial es que presentan un hueco en la zona central del citoplasma, en cuyo interior se encuentra un número variable de 1 a 14 células tumorales y/o células sanguíneas como eritrocitos, linfocitos o neutrófilos. No hay presencia de lípidos en el interior del canal (Técnica histoquímica de Sudan III negativa). Cuando son varias ELCs unidas formando un canal central, son de citoplasma aplanado y elevada malignidad nuclear (**Figura 5, 6 y 7**).

Los tipos tumorales que presentaron las ELCs dentro del grupo CI fueron, carcinoma anaplásico (n=2), carcinoma tubular (n=2), carcinoma papilar (n=1), carcinoma sólido (n=1) y carcinoma rico en lípidos (n=1). El TMM no-CI que presentó ELCs se diagnosticó como carcinoma anaplásico.

El número de ELCs presentes en cada muestra tisular fue variable dependiendo del tumor; fueron abundantes en 5 de los 7 CI que presentaron este tipo de células y en el TMM no-CI.

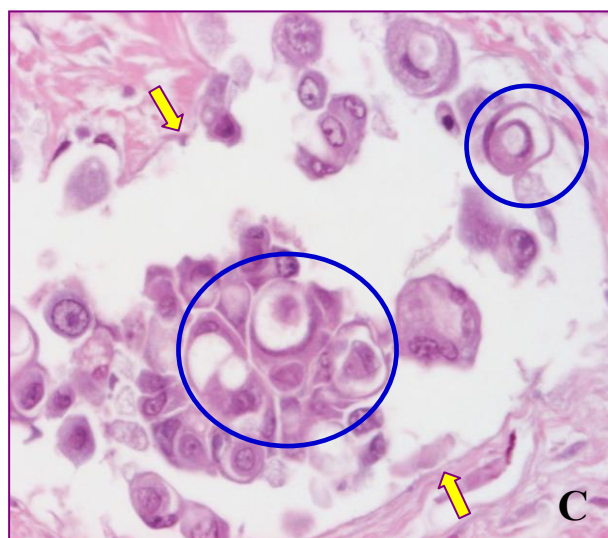
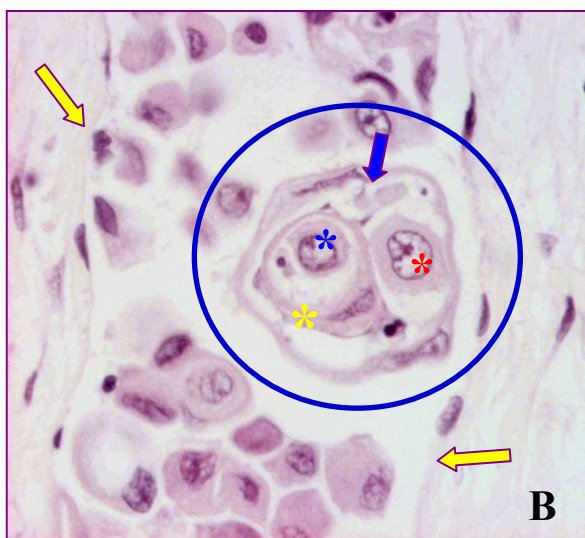
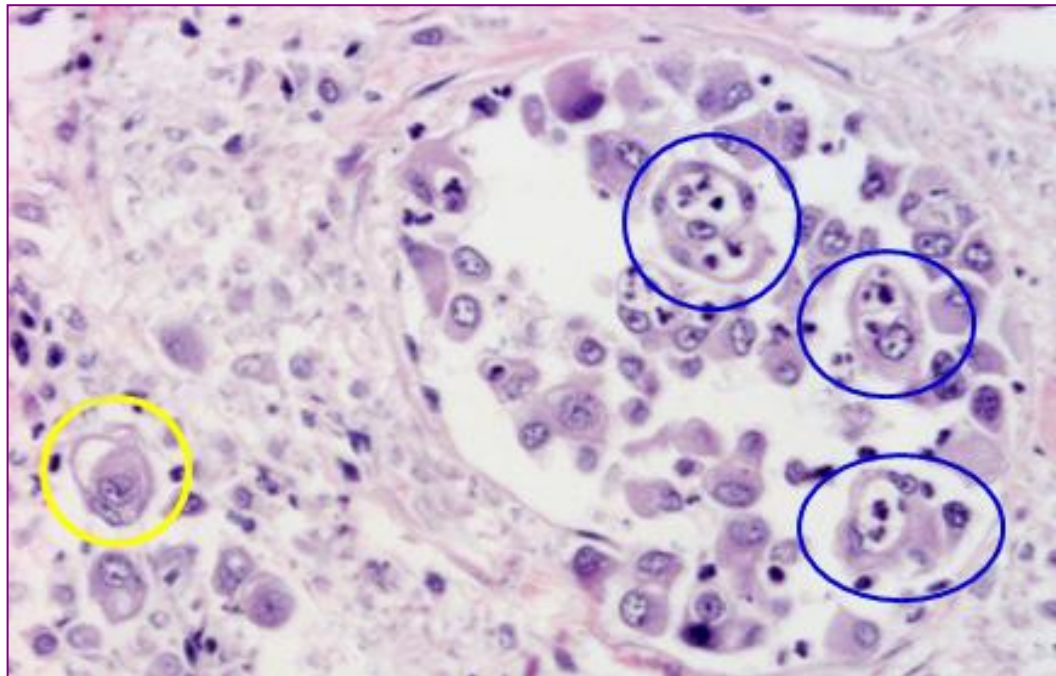


Figura 5. Células tumorales semejantes a endoteliales (ELCs), H-E. **A)** ELCs (círculos azules) en un émbolo tumoral en el interior de un vaso linfático e infiltrando el estroma (círculo amarillo) (x20). **B)** ELCs (círculo) en un émbolo tumoral en el interior de un vaso linfático (flechas amarillas) que contienen en su interior un glóbulo rojo (flecha azul), una célula tumoral (* rojo) y otra ELC (* amarillo) que, a su vez, contiene una célula tumoral en su interior (* azul) (x40). **C)** ELCs (círculo) con células tumorales en su interior, en un émbolo tumoral dentro de un vaso linfático (flechas) (x20).

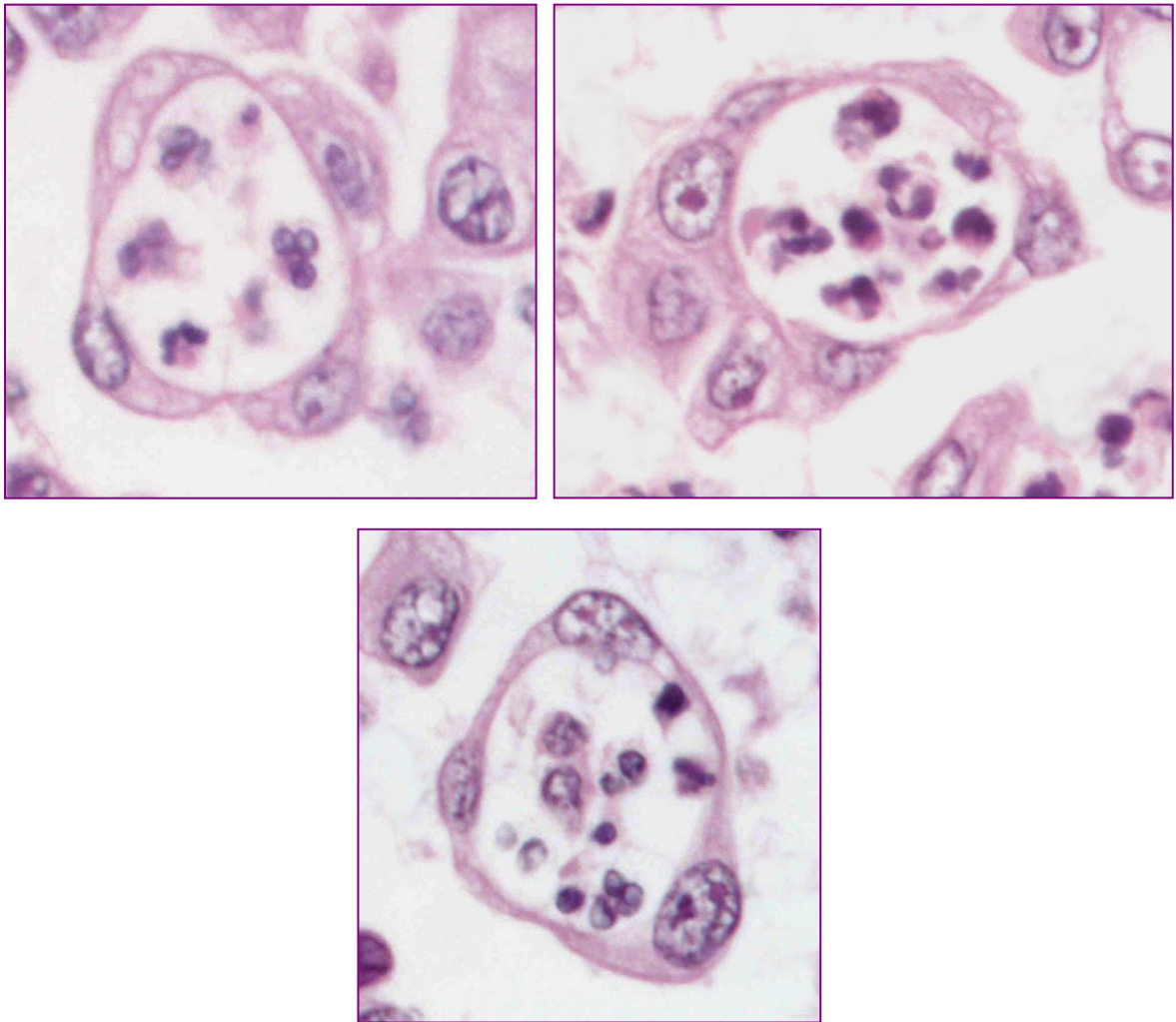


Figura 6. Células tumorales semejantes a endoteliales (ELCs), H-E (x40). Grupos de células tumorales semejantes a endoteliales (ELCs) que forman estructuras similares a pequeños capilares (mimetismo vascular). En el interior de estos canales se observan células sanguíneas y restos de células degeneradas.

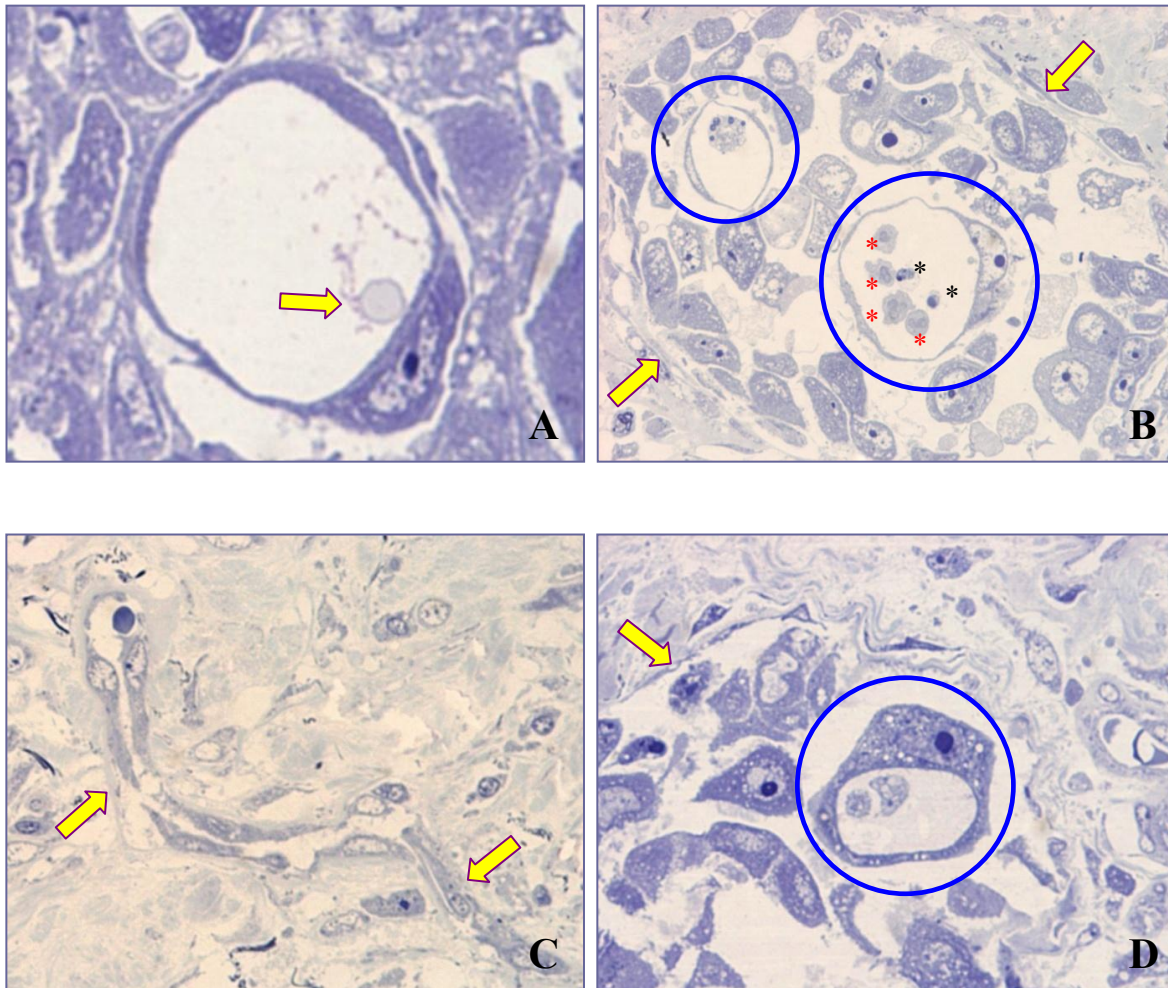


Figura 7. CI mamario canino. Células tumorales semejantes a endoteliales (ELCs). Cortes semifinos. Tinción azul de metileno. **A)** ELC aislada que contiene un eritrocito en el interior del canal que forma (flecha) (x40). **B)** ELCs (círculo) en el interior de un émbolo tumoral en un vaso linfático (flecha). ELC arriba a la izquierda con restos de una célula degenerada en su interior. ELC abajo derecha con 4 neutrófilos (* rojo) y con cuerpos apoptóticos (* negro) en el interior del canal que forma (x20). **C)** ELCs formando un canal de mimetismo vascular (flechas) (x10). **D)** ELC (círculo) en el interior de un émbolo tumoral en un vaso linfático que contiene restos de células degeneradas en su canal interior (x20).

1.3. Caracterización inmunohistoquímica de tipos celulares

1.3.1. Valoración de la inmunotinción y clasificación del origen y tipo tumoral

La inmunoeexpresión de **pancitoqueratina** (clon AE1/AE3) se localizó de forma difusa en el citoplasma celular, a excepción de 4 tumores del grupo CI en los que las células mostraron una tinción ligera en el citoplasma y fuerte en la membrana celular. En general, todas las células tumorales de origen epitelial expresaron pancitoqueratina (**Figura 8**), tanto en los tumores del grupo CI como TMM no-CI, excepto en algunos casos en los que algunas células habían perdido las citoqueratinas por la indiferenciación tumoral. Se confirmó el origen epitelial de los carcinomas ricos en lípidos presentes en el grupo de CI, puesto que también fueron positivos a las citoqueratinas y negativos a vimentina (**Figura 9**). Las células tumorales de origen mioepitelial, presentes en algunos TMM no-CI fueron positivas a la pancitoqueratina en 13 de las 16 (81,25%) muestras donde estaban presentes. Ninguna de las células neoplásicas de origen mesenquimatoso fue positiva al marcador de pancitoqueratina en los grupos CI y TMM no-CI. Los miofibroblastos fueron negativos a la tinción con pancitoqueratina (**Figura 10**).

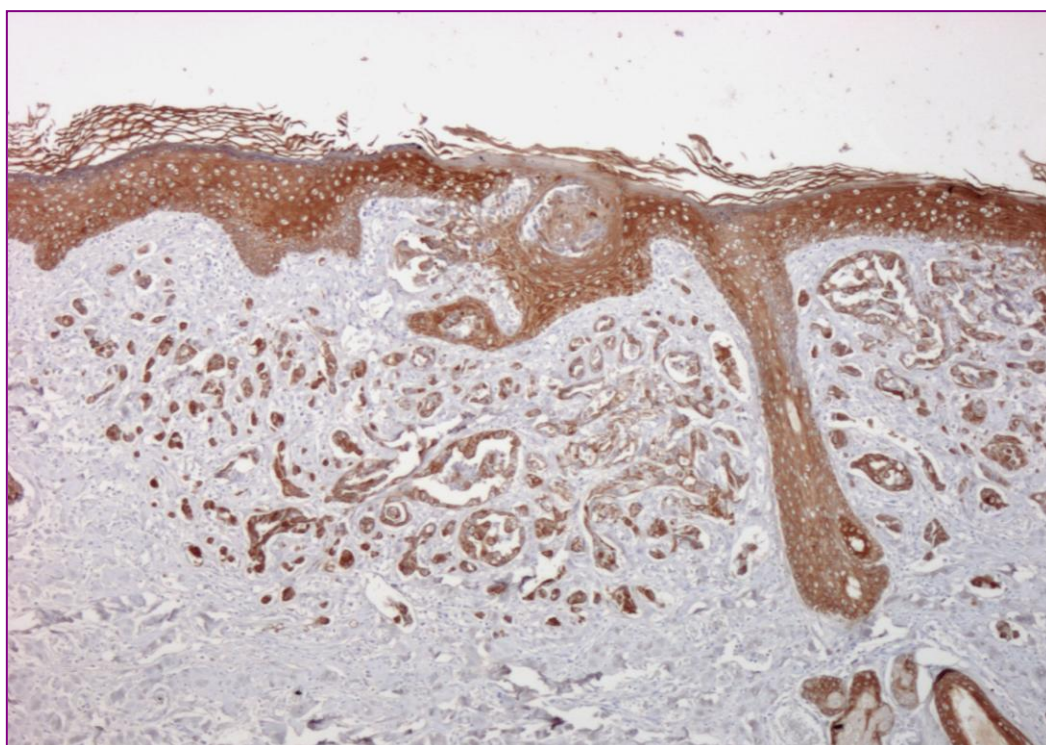


Figura 8. CI mamario canino. Técnica de estreptavidina-biotina-peroxidasa anti-pancitoqueratina. Células tumorales epiteliales positivas a pancitoqueratina (x4).

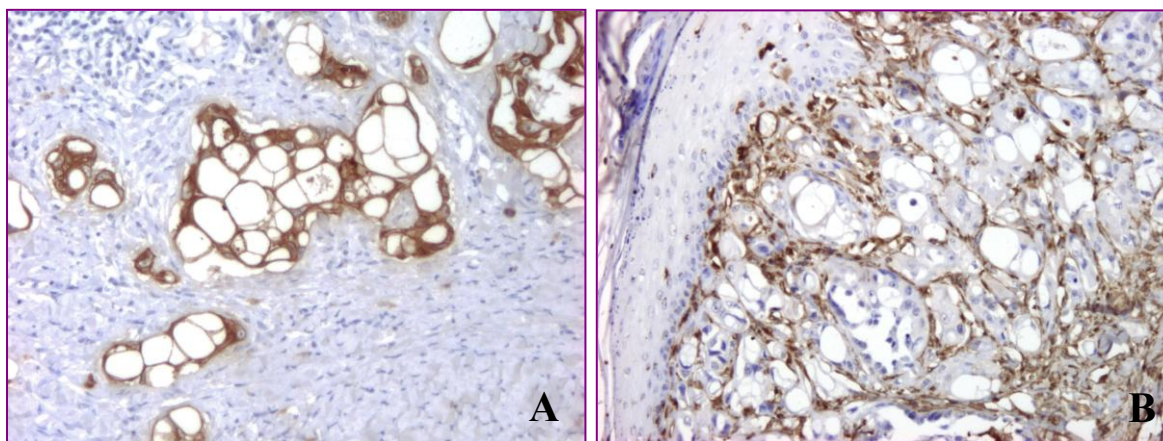


Figura 9. CI mamario canino. Carcinoma lipídico. Técnica de estreptavidina-biotina-peroxidasa. **A)** Anti-pancitoqueratina. Células tumorales lipídicas positivas. **B)** Anti-vimentina. Células tumorales lipídicas negativas.

La inmunotinción de la **citoqueratina 14** fue citoplasmática difusa, en todos los casos. Nueve de los 21 (42,9%) CI epiteliales, fueron positivos a la citoqueratina 14 (>80% células positivas) y 4 tumores más presentaron positividad en alguna de sus células epiteliales tumorales, aunque en menos del 80%. De los 16 TMM no-CI con células epiteliales, 8 (50%) de ellos fueron positivos a citoqueratina 14 y el resto negativos. Las células mioepiteliales presentes en 16 TMM no-CI fueron positivas a la inmunotinción con citoqueratina 14 en todos los casos. Los miofibroblastos fueron negativos (**Figura 10**).

La tinción con **vimentina** se localizó siempre en el citoplasma celular, independientemente del tipo celular inmunoteñido (epitelial o mesenquimatoso). En los tumores del grupo CI se observó que 15 de los 21 (71,4%) tumores de origen epitelial co-expresaron citoqueratina (pancitoqueratina) y vimentina. Dentro del grupo TMM no-CI, en 6 de los 16 (37,5%) tumores que presentan células epiteliales, éstas co-expresaron citoqueratina (pancitoqueratina) y vimentina. Todos los tumores de origen mesenquimatoso, las células mioepiteliales y los miofibroblastos fueron positivos a vimentina (**Figura 10**).

La expresión inmunohistoquímica de la **actina** de músculo liso se localizó siempre en el citoplasma celular. En ningún caso se observó inmunotinción en las células epiteliales neoplásicas de los tumores de CI o TMM no-CI. Todas las neoplasias de origen mesenquimatoso, las células mioepiteliales y los miofibroblastos fueron positivas a la tinción inmunohistoquímica con actina (**Figura 10**).

La inmunotinción con **desmina** fue siempre observada en el citoplasma celular. Las células epiteliales tumorales fueron negativas en todos los casos, tanto del grupo CI como TMM no-CI. Las células mioepiteliales fueron negativas a la inmunotinción con desmina en todos los tumores; a excepción de 2 de los 16 (12,5%) TMM no-CI que contenían células mioepiteliales, donde la mayoría de éstas fueron positivas. Los miofibroblastos fueron negativos a la inmunotinción con desmina, excepto en 4 de los 22 (18,2%) CI y de 1 de los 5 (20%) casos que contenían miofibroblastos, donde se observó algún miofibroblasto aislado positivo a desmina (**Figura 10**).

Para todos los marcadores, la inmunotinción de las ELCs fue semejante a la que mostraron el resto de células epiteliales neoplásicas del tumor en el que se localizaron (**Figura 11**).

Todos los tumores pertenecientes a los grupos CI y TMM no-CI fueron clasificados por su **origen tumoral y tipo tumoral**, basándonos en el criterio descrito en el apartado de material y métodos.

La evaluación de la inmunotinción de las células neoplásicas presentes en las 22 muestras de CI, reveló que en 21 de los 22 (95,4%) tumores el origen de las células tumorales fue epitelial y que el caso restante (4,6%) tenía origen mesenquimatoso (ver **Figura 3**, sarcoma). Los tumores de origen epitelial fueron de tipo simple, en los que únicamente intervinieron células epiteliales en el proceso tumoral, sin la presencia de células mioepiteliales neoplásicas. En el tumor restante, las células tumorales fueron de origen mesenquimatoso (caso **CI 14**, diagnosticado como sarcoma).

En 14 (70%) de las 20 neoplasias del grupo TMM no-CI, el origen celular neoplásico fue epitelial. Dentro de éstos, 7 (50%) eran de tipo complejo (integrados por células epiteliales y mioepiteliales), 3 (21,4%) se consideraron de tipo simple (integrados por células epiteliales, aunque también existía una pequeña cantidad de células mioepiteliales) y otros 4 más fueron de tipo simple (integrados por células epiteliales (n=2, 10%) o por células mioepiteliales (n=2, 10%)). Cuatro de los 20 (20%) tumores TMM no-CI, se correspondieron con carcinosarcomas y por tanto, parte del tumor tenía origen epitelial (células epiteliales y mioepiteliales) y parte mesenquimatoso. Por último, los dos tumores restantes (10%) del grupo TMM no-CI fueron de origen mesenquimatoso.

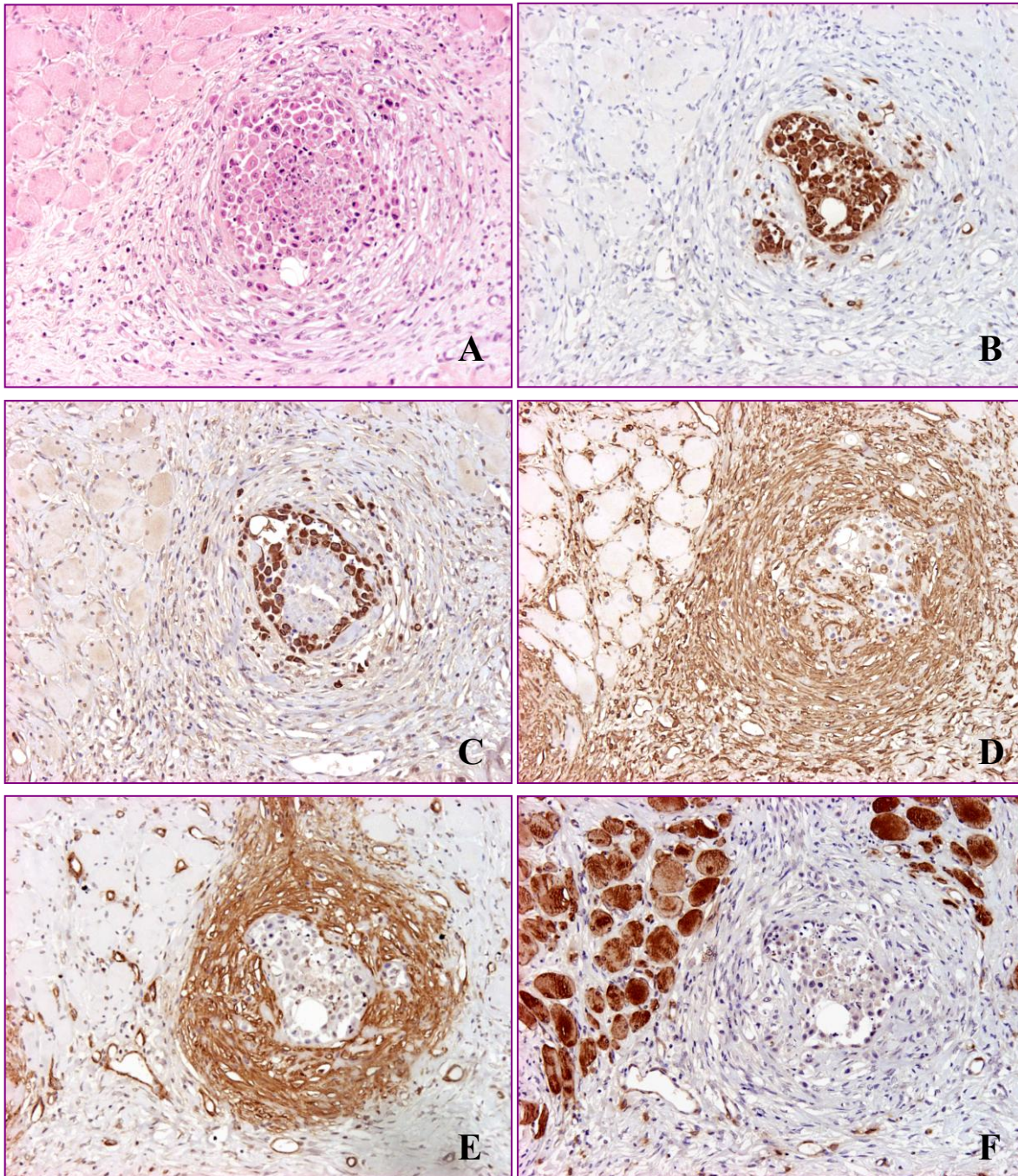


Figura 10. Caracterización inmunohistoquímica de tipos celulares (técnica de estreptavidina-biotina-peroxidasa). CI mamario canino. Cortes seriados (x20). **A)** H-E. **B)** Anti-pancitoqueratinas. Células tumorales de origen epitelial positivas. Miofibroblastos negativos. **C)** Anti-citoqueratina 14. Células tumorales basales positivas y centrales negativas. Miofibroblastos negativos. **D)** Anti-vimentina. Células tumorales epiteliales positivas y negativas. Miofibroblastos y estroma positivos. **E)** Anti-actina. Células tumorales negativas. Miofibroblastos positivos dispuestos en círculos concéntricos alrededor de las células tumorales. **F)** Anti-desmina. Células tumorales negativas. Miofibroblastos negativos. Músculo y vasos positivos.

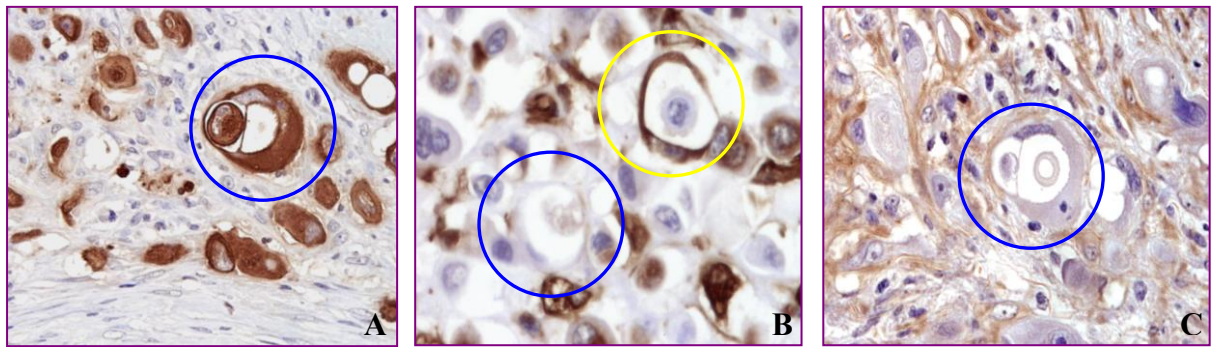


Figura 11. Caracterización inmunohistoquímica de tipos celulares. Técnica estreptavidina-biotina-peroxidasa. ELCs. **A)** Anti-pancitoqueratina. ELC (círculo) positiva (x20). **B)** Anti-vimentina. ELC positiva (círculo amarillo). ELC negativa (círculo azul) (x40). **C)** Anti-actina. ELC negativa (círculo) (x20).

Teniendo en cuenta el criterio establecido en el apartado de material y métodos por el que se evalúa la inmuntinción de las neoplasias que contienen células epiteliales tumorales, para **comparar la inmunoexpresión** de los tumores del grupo CI y TMM no-CI, se incluyeron 21 de los 22 casos de CI y 16 de los 20 casos de TMM no-CI. Los resultados obtenidos se encuentran resumidos en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Inmunoexpresión de las células epiteliales tumorales de las neoplasias pertenecientes a los grupos CI y TMM no-CI.

| | Pan-Citoqueratinas | | Citoqueratina 14 | | Vimentina | | α -Actina | | Desmina | |
|-------------------------------------|--------------------|---------|------------------|-------------|-------------|-------------|------------------|------------|---------|------------|
| | + | - | + | - | + | - | + | - | + | - |
| CI Epiteliales (n=21) | 21 100% | 0 0% | 9* 42,9% | 8* 38,1% | 15 71,4% | 6 28,6% | 0 0% | 21 100% | 0 0% | 21 100% |
| TMM no-CI Epiteliales (n=16) | 16 100% | 0 0% | 8 50% | 8 50% | 6 37,5% | 10 62,5% | 0 0% | 16 100% | 0 0% | 16 100% |

*En 4 casos hubo células epiteliales tumorales en <80%

1.3.2. Estudio de detección de células mioepiteliales y miofibroblastos

Como describimos en el apartado de material y métodos, la presencia o ausencia de células mioepiteliales y miofibroblastos se valoró con H-E y mediante la evaluación de los marcadores inmunohistoquímicos de estirpe celular (pancitoqueratina, citoqueratina 14, vimentina, actina y desmina).

1.3.2.1. Cuantificación de células mioepiteliales y miofibroblastos

La cantidad y el tipo de células **mioepiteliales** fueron variables. En general, los CI no presentaron células mioepiteliales, mientras que pudieron llegar a ser abundantes en tumores del grupo TMM no-CI, como se describe a continuación.

Dentro del grupo CI, se determinó con H-E que 6 de los 22 (27,3%) tumores presentaban células mioepiteliales, basales en 3 casos y/o estrelladas en 4 casos. Sin embargo, una vez evaluadas las tinciones inmunohistoquímicas con los marcadores de citoesqueleto, que permiten diferenciar las células mioepiteliales (pancitoqueratina positiva y/o citoqueratina-14 positiva, vimentina positiva, actina positiva, desmina positivo/negativo) de los miofibroblastos (citoqueratinas (pancitoqueratina y -14) negativa, vimentina positiva, actina positiva, desmina positivo/negativo), se confirmó la presencia de algunas células mioepiteliales basales sólo en 2 tumores, y estrelladas en 1. En estos 3 casos, las células mioepiteliales se encontraban en pequeñas cantidades y no estaban proliferando (negativas a Ki-67). Por otro lado, en un tumor en el que no se encontraron células mioepiteliales con H-E, éstas se localizaron a través de la inmunotinción de los marcadores.

Con H-E, 14 de los 20 (70%) TMM no-CI presentaron células mioepiteliales basales (12 casos) y/o estrelladas (5 tumores) y en los tumores restantes éstas no se observaron o no eran distinguibles de los miofibroblastos. Una vez evaluados los resultados de la tinción inmunohistoquímica, fundamentalmente la inmunexpresión de la citoqueratina-14, se detectó la presencia de células mioepiteliales en 16 de las 20 (80%) muestras (basales 14 casos y/o estrelladas 11 casos).

La cantidad de **miofibroblastos** presentes en las diferentes muestras tumorales fue variable, aunque en general, la cantidad de miofibroblastos fue claramente mayor en los tumores CI que en los TMM no-CI. Como se describe en el apartado de material y métodos, a cada uno de los tumores se le asignó un valor de cantidad de miofibroblastos, estos resultados se resumen en la **Tabla 4**.

Tabla 4. Cuantificación de miofibroblastos presentes en los grupos CI y TMM no-CI.

| Tumor Miofibr. | CI | | TMM no-CI | |
|-------------------|----|------|-----------|-----|
| | n | % | n | % |
| 0 | 0 | 0 | 15 | 75 |
| 1 | 7 | 32 | 4 | 20 |
| 2 | 5 | 23 | 1 | 5 |
| 3 | 11 | 50 | 0 | 0 |
| Total positivos | 22 | 100% | 5 | 25% |

En la mama normal no se observaron miofibroblastos, en ninguna de las muestras.

1.3.2.2. Disposición de miofibroblastos

La disposición de los miofibroblastos dentro de los tejidos tumorales de los CI fue de dos tipos: concéntrica (rodeando grupos de células tumorales) y dispersa en el estroma formando bandas no concéntricas (**Figura 12**).

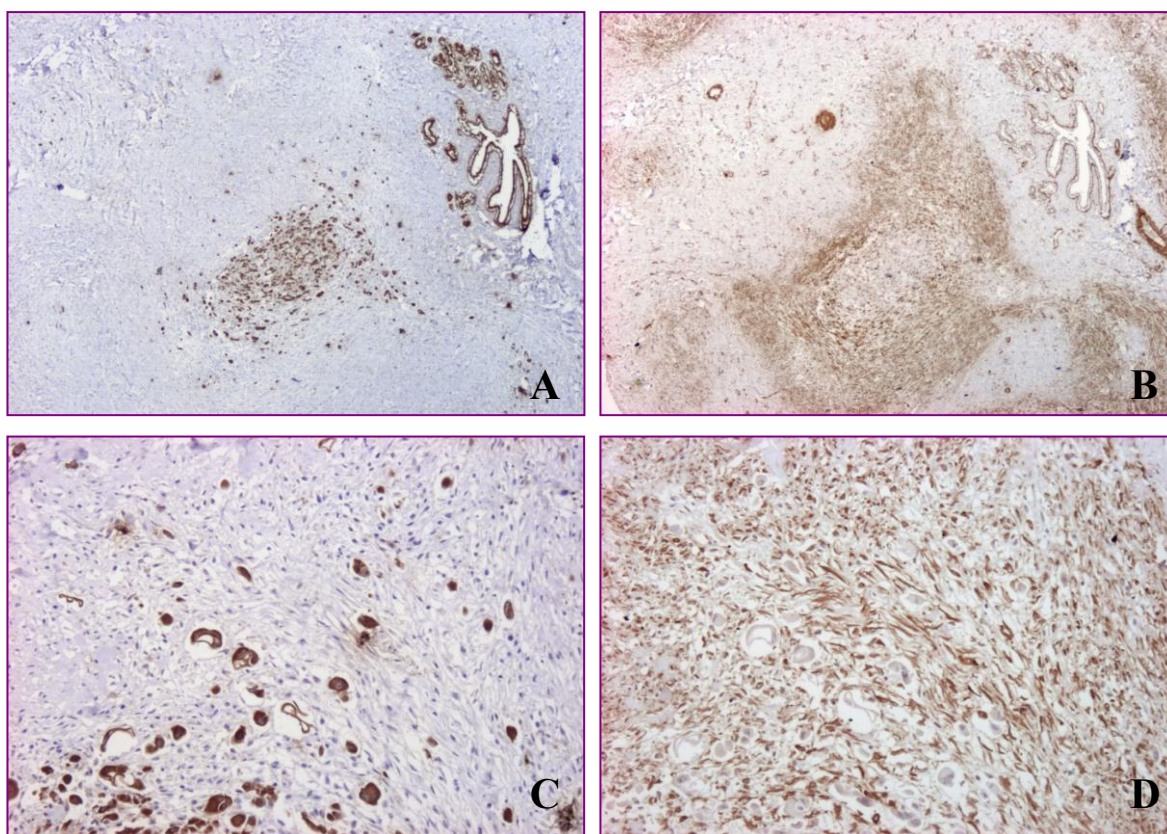


Figura 12. CI mamario canino. Técnica estreptavidina-biotina-peroxidasa. Disposición de miofibroblastos en cortes seriados (A/B y C/D). **A)** (x2) y **C)** (x10) Anti-pancitoqueratina. Células tumorales positivas y miofibroblastos negativos. **B)** y **D)** Anti-actina. **B)** Disposición concéntrica de miofibroblastos, positivos (x2). **D)** Miofibroblastos positivos dispersos en el estroma (x10).

Para los tumores del grupo CI, se observó que en 17 de los 22 casos (77,27%), los miofibroblastos se dispusieron formando círculos concéntricos alrededor de las células tumorales, dando lugar a una estructura similar a un ovillo, con el centro ocupado por células tumorales altamente malignas. Independientemente de la cantidad total de miofibroblastos asignada a cada tumor, se apreció que la reacción miofibroblástica en las formaciones concéntricas fue mayor cuando las células tumorales rodeadas se encontraban invadiendo el tejido mamario, o formando émbolos dentro de vasos con disposición invasiva subendotelial y/o con rotura de la pared del vaso. Por el contrario, estos círculos concéntricos de miofibroblastos fueron menores en los tumores en los que las células tumorales se encontraban en el interior de los vasos formando émbolos tumorales, pero en el medio de la luz del vaso, sin contacto con las células endoteliales para la invasión del estroma. En los 5 casos restantes, los miofibroblastos se encontraron de forma dispersa por el estroma o formando bandas entre las células tumorales aisladas que se encontraban infiltrando el estroma.

De los 5 TMM no-CI que contienen miofibroblastos, éstos se dispusieron en círculos concéntricos (3 tumores) y/o en bandas entre las células tumorales del estroma (4 tumores).

1.4. Estudio inmunohistoquímico de receptores hormonales

1.4.1. Estudio inmunohistoquímico del receptor RE α

Se realizó la tinción inmunohistoquímica de 22 CI, 20 TMM no-CI y de 4 MN con el anticuerpo monoclonal C-311 anti-receptor de estrógenos alfa (RE α). La inmunotinción fue localizada en el núcleo celular. En alguno de los tejidos tumorales (CI y TMM no-CI), se pudo observar, también, tinción citoplasmática de intensidad variable (de ligera a fuerte) en algunos grupos de células (**Figura 13**). No obstante, para la valoración de la inmunotinción sólo se tuvo en cuenta la tinción nuclear.

En los tejidos tumorales (CI y TMM no-CI), las células del estroma (fibroblastos, miofibroblastos y células endoteliales), fueron negativas a la tinción con RE α . Por otro lado, se localizó inmunotinción en el núcleo de las células neoplásicas (epiteliales, mioepiteliales y/o mesenquimatosas) de algunos tumores (**Figura 13**). En los tumores que fueron positivos al RE α , la intensidad de la inmunotinción fue heterogénea en las células

tumorales. Las ELCs mostraron inmunotinción semejante a la del resto de las células tumorales del tumor en el que se localizaban. Para una mejor comprensión de los resultados obtenidos en las ELCs, en el apartado **1.8** se muestra una tabla resumen de las características inmunohistoquímicas encontradas en éstas.

En la mama normal, las células del estroma fueron generalmente negativas. Por el contrario, las células epiteliales y mioepiteliales de la glándula mamaria normal fueron positivas, presentando una inmunotinción homogénea, de fuerte intensidad en todos los casos (**Figura 13**).

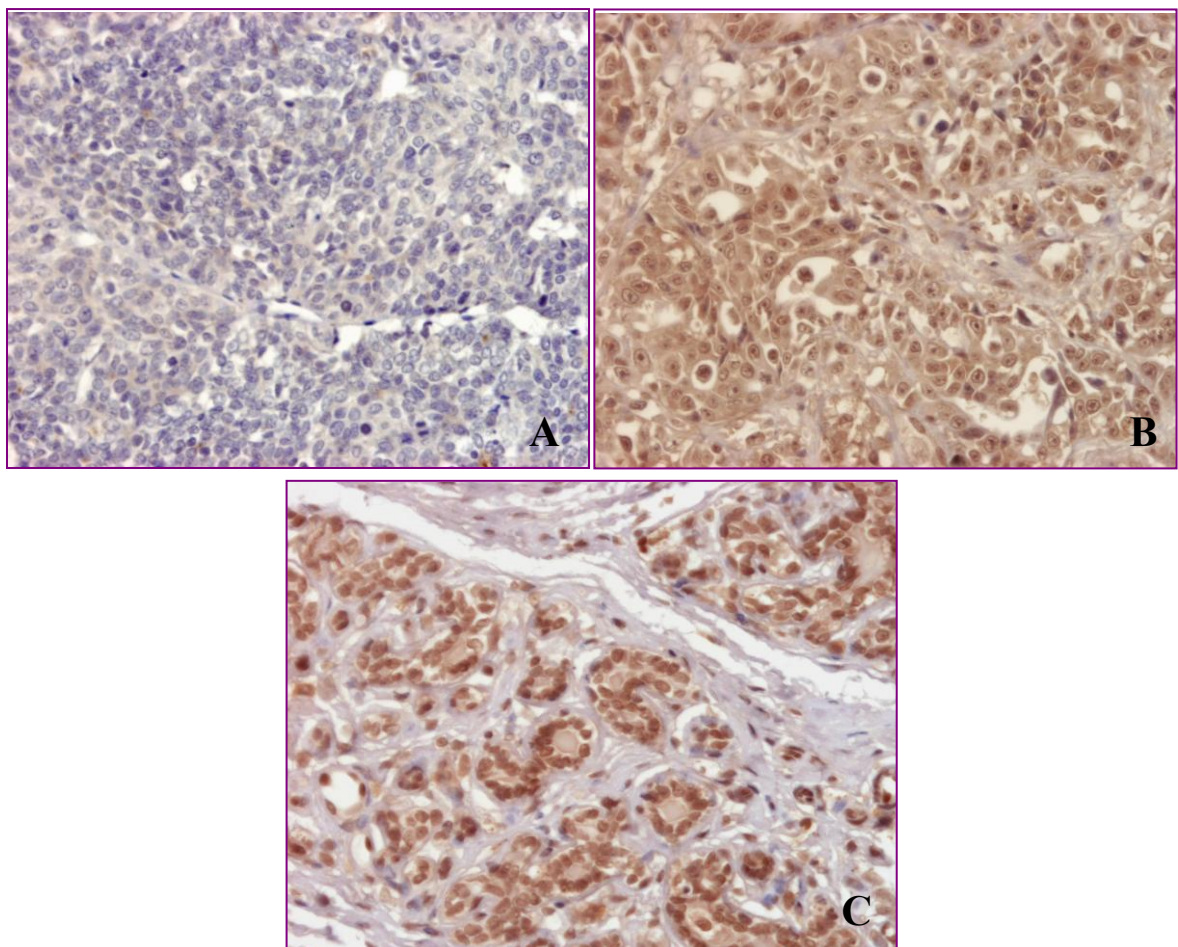


Figura 13. Técnica estreptavidina-biotina-peroxidasa anti-RE α (x20). **A)** CI mamario canino negativo. **B)** TMM no-CI positivo. **C)** MN positiva.

Los resultados de la inmunoexpresión de las células neoplásicas y de la MN de los 42 tejidos tumorales (22 CI y 20 TMM no-CI) y de los 4 tejidos de MN con el marcaje inmunohistoquímico del anti-RE α , se encuentran resumidos en la **Tabla 5**.

Tabla 5. Inmunoexpresión del RE α en los grupos CI, TMM no-CI y MN.

| Intensidad Grupo | 0 | 1 | 2 | 3 |
|------------------------------------|---------------|-------------|-------------|------------|
| CI (n= 22) | 19 (86,4%) | 1 (4,5%) | 2 (9,1%) | 0 (0%) |
| TMM no-CI (n= 20) | 14 (70%) | 0 (0%) | 4 (20%) | 2 (10%) |
| MN (n= 4) | 0 (0%) | 0 (0%) | 2 (50%) | 2 (50%) |

Tres de los 22 CI (13,63%) fueron positivos al RE α con intensidad leve o moderada y seis de 20 (30%) TMM no-CI fueron positivos con intensidad de inmunotinción de moderada a fuerte. No existieron diferencias significativas entre los grupos CI y TMM no-CI para la positividad ($p=0,19$) o la intensidad ($p= 0,22$) de expresión del RE α . En la mama normal, todos los tejidos fueron positivos al RE α , con una intensidad de inmunoexpresión de moderada a fuerte.

1.4.2. Estudio inmunohistoquímico del RE β

Se realizó la inmunotinción de 22 muestras procedentes de CI mamarios caninos, 20 TMM no-CI y 4 mamas normales con el anticuerpo policlonal anti-receptor de estrógenos beta (RE β). La inmunoexpresión se localizó en el núcleo de las células, salvo algunas excepciones, en las que se apreció una tinción citoplasmática de intensidad ligera o moderada en algún grupo celular (**Figura 14**). De la misma manera que para el RE α , sólo se valoró la inmunotinción de los núcleos de las células tumorales y epiteliales de la mama normal.

La expresión de RE β fue heterogénea dentro de una misma muestra tumoral y se localizó en el estroma, en algunos fibroblastos, miofibroblastos y en células endoteliales; sin embargo, las células inflamatorias no mostraron presencia de RE β . El cartílago y el tejido óseo de los tumores mixtos fueron también negativos. El RE β se localizó en las células neoplásicas, aunque variando el porcentaje y la intensidad de las células inmunoteñidas en los diferentes tumores (**Figura 14**). La inmunoexpresión del RE β en las ELCs fue semejante a la mostrada por el resto de células tumorales, en cada caso.

En las muestras de mama normal, el RE β se expresó homogénea e intensamente en las células epiteliales y mioepiteliales de la glándula mamaria. Las células del estroma fueron negativas a dicho marcador (**Figura 14**).

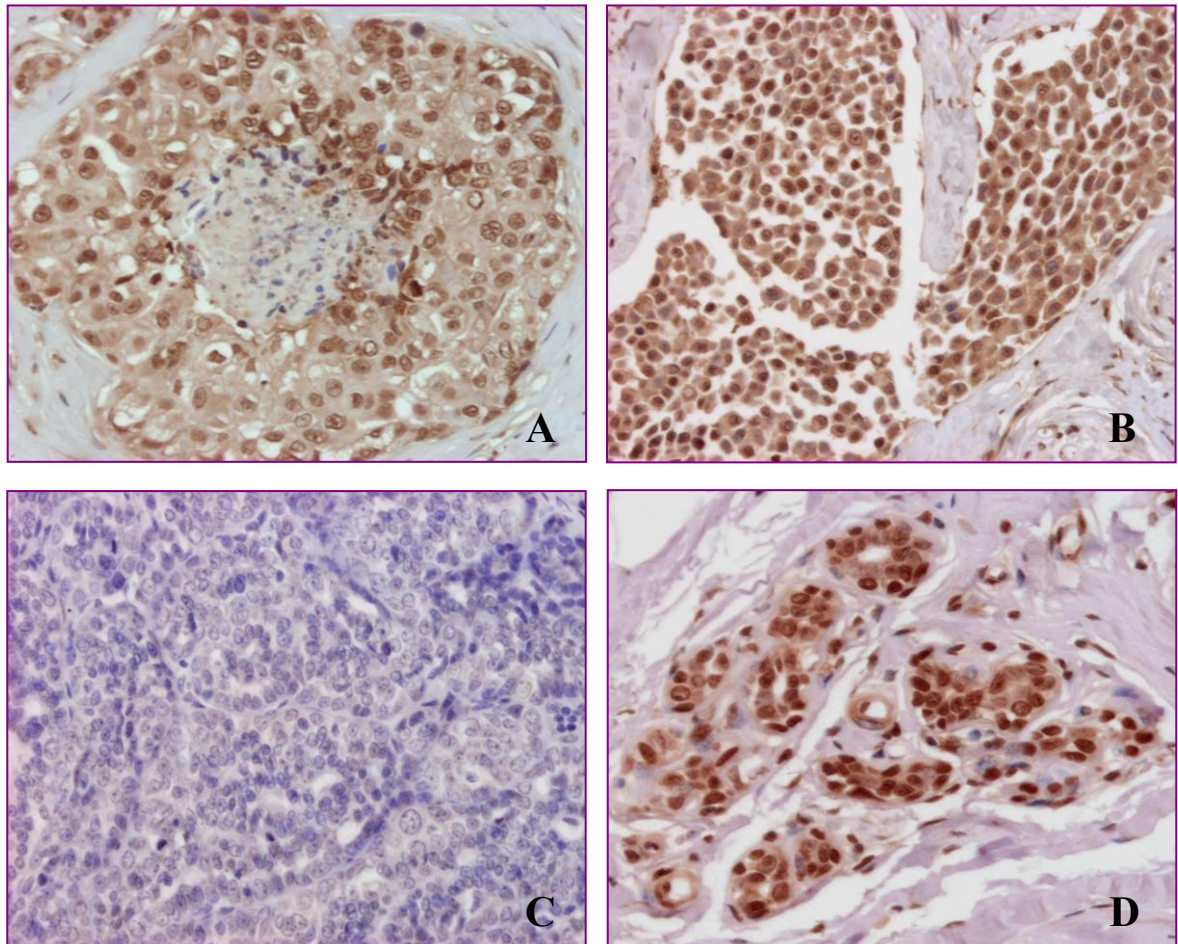


Figura 14. Técnica estreptavidina-biotina-peroxidasa anti-RE β (x20). **A)** y **B)** CI mamario canino positivo. **C)** TMM no-CI negativo. **D)** MN positiva.

Los resultados obtenidos de la tinción inmunohistoquímica presente en 22 CI, 20 TMM no-CI y 4 MN con el anti-RE β , se encuentran resumidos en la **Tabla 6**.

Tabla 6. Inmunoexpresión del REβ en los grupos CI, TMM no-CI y MN.

| Intensidad Grupo | 0 | 1 | 2 | 3 |
|----------------------|------------|--------------|--------------|--------------|
| CI (n= 22) | 0 (0%) | 8 (36,4%) | 8 (36,4%) | 6 (27,3%) |
| TMM no-CI (n= 20) | 3 (15%) | 6 (30%) | 7 (35%) | 4 (20%) |
| MN (n= 4) | 0 (0%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 4 (100%) |

Todos los CI (100%) y 17 de los 20 (85%) TMM no-CI teñidos con el marcador de REβ, mostraron intensidad de inmunotinción variable en sus células tumorales. En la mama normal, todas las muestras fueron positivas al REβ y la intensidad de inmunoexpresión fue fuerte para todos los casos. Mediante análisis estadístico se comprobó que la presencia de REβ es significativamente más frecuente en los tumores CI que en los TMM no-CI ($p=0,05$), aunque no existieron diferencias en cuanto a la intensidad de expresión ($p=0,30$).

1.4.3. Estudio inmunohistoquímico del RP

Se llevó a cabo la inmunotinción de 22 muestras de CI, 20 de TMM no-CI y 4 MN con el anticuerpo monoclonal NCL-PGR/2 anti-receptor de progesterona (RP). La inmunoexpresión se localizó en el núcleo, a excepción de algún CI y/o TMM no-CI, en los que se pudo apreciar tinción citoplásmica de intensidad ligera o moderada en alguna de las células tumorales.

En los tejidos tumorales (CI y TMM no-CI), la inmunotinción se observó en las células neoplásicas y en la mayoría de las células del estroma, fibroblastos y miofibroblastos. Las células endoteliales fueron negativas, salvo excepciones (**Figura 15**). Los tejidos cartilaginoso y óseo de los tumores mixtos fueron negativos al RP.

Las células epiteliales y mioepiteliales de la mama normal fueron positivas y las células del estroma se tiñeron de forma similar a lo descrito para los tumores, aunque de manera menos evidente (**Figura 15**).

La inmunoexpresión de las células tumorales fue bastante homogénea dentro de la misma muestra tumoral. Las ELCs presentaron la misma intensidad de inmunotinción que el resto de las células tumorales del tejido en el que se localizaban.

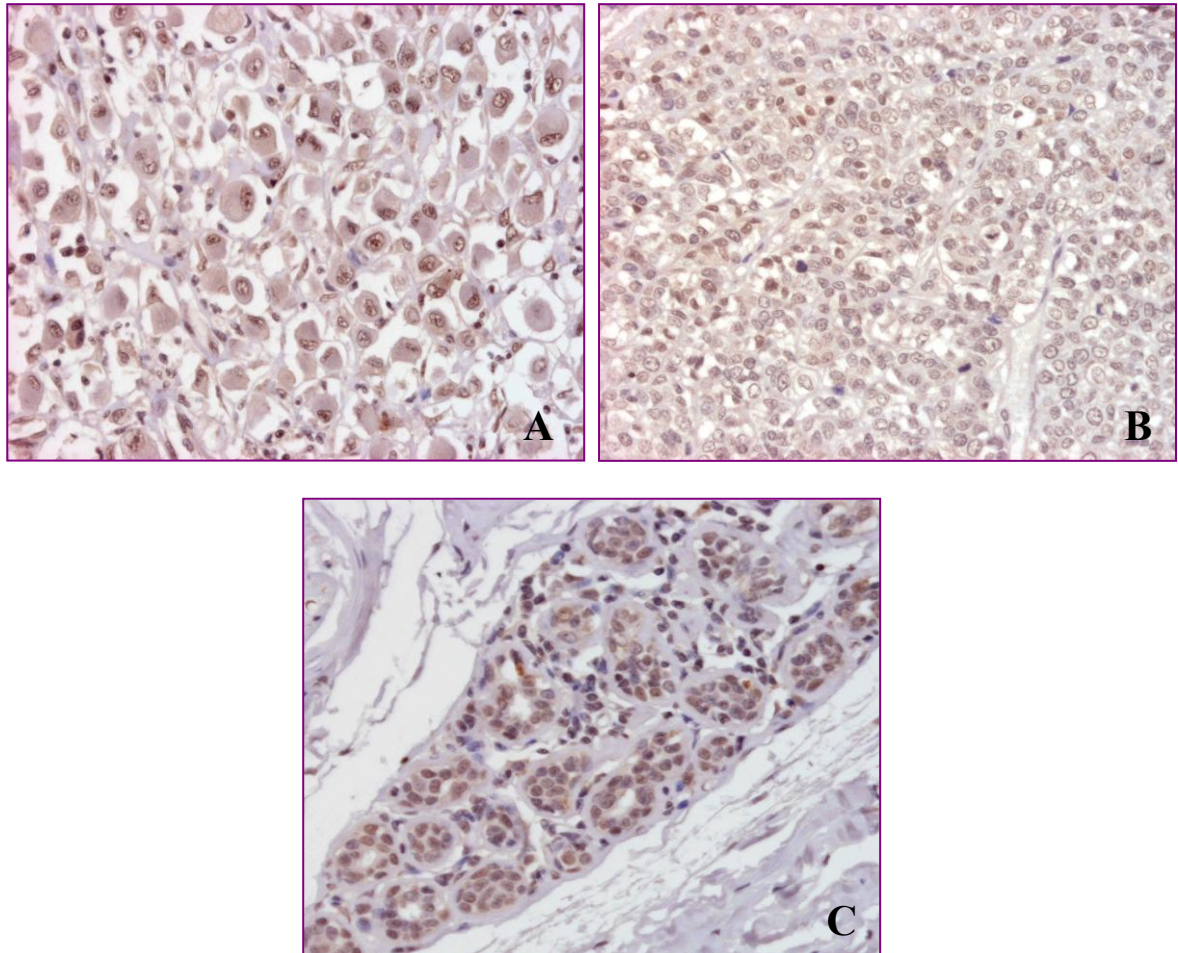


Figura 15. Técnica estreptavidina-biotina-peroxidasa anti-RP (x20). **A)** CI mamario canino positivo. **B)** TMM no-CI positivo. **C)** MN positiva.

El porcentaje de casos negativos y positivos y la intensidad de las células tumorales y/o de la glándula mamaria normal de los casos positivos a la inmunotinción con el anticuerpo anti-RP, se encuentran resumidos en la **Tabla 7**.

Tabla 7. Inmunoexpresión del **RP** en los grupos CI, TMM no-CI y MN.

| Intensidad Grupo | 0 | 1 | 2 | 3 |
|------------------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| CI (n= 22) | 6 (27,3%) | 5 (22,7%) | 6 (27,3%) | 5 (22,7%) |
| TMM no-CI (n= 20) | 5 (25%) | 13 (65%) | 0 (0%) | 2 (10%) |
| MN (n= 4) | 0 (0%) | 4 (100%) | 0 (0%) | 0 (0%) |

En los CI, 17 de los 22 (72,72%) tumores fueron positivos a la inmunotinción del RP. En los TMM no-CI, fueron 15 de 20 (75%) los tumores positivos a RP. La mama normal fue positiva, aunque con intensidad ligera, en las células epiteliales y mioepiteliales. No existieron diferencias significativas en cuanto a los tumores RP positivo y RP negativo entre los grupos CI y TMM no-CI ($p=0,867$). Sin embargo, la intensidad de inmunoexpresión fue significativamente mayor en los casos de CI con respecto a los de TMM no-CI ($p=0,012$).

1.4.4. Estudio inmunohistoquímico del RA

Se llevó a cabo la tinción inmunohistoquímica de 22 muestras procedentes de CI mamario, de 20 muestras de TMM no-CI y de 4 tejidos de MN con el anticuerpo monoclonal Ab-2 anti-receptor de andrógenos (RA). En todos los tumores, la inmunoexpresión apareció en el núcleo celular. Existió cierta tinción citoplasmática de intensidad variable en algunas células tumorales en los grupos CI y/o TMM no-CI, que no se tuvo en cuenta para la valoración de la inmunotinción.

En las muestras tumorales (CI y TMM no-CI), la inmunotinción fue heterogénea dentro de un mismo tumor, detectándose en el estroma tumoral, en los fibroblastos, miofibroblastos. Las células endoteliales fueron negativas al marcador del RA, salvo algunas excepciones. Las células del cartílago y del tejido óseo de los tumores mixtos tampoco contenían RA. Las células neoplásicas fueron positivas con diferente proporción e intensidad dependiendo del caso, aunque dentro del mismo tumor, la tinción fue homogénea (**Figura 16**). En general, los tumores del grupo de CI fueron más positivos al RA y presentaron mayor intensidad de expresión. En cuanto a las ELCs, se observó una

tinción semejante a la del resto de células tumorales del tejido del que procedían (**Figura 16**).

En las muestras de MN, la inmunotinción fue homogénea y confinada en el núcleo de las células epiteliales y mioepiteliales, siendo el estroma negativo al RA. La intensidad de inmunotinción, en general, fue menor que la observada en los tejidos mamarios neoplásicos (**Figura 16**).

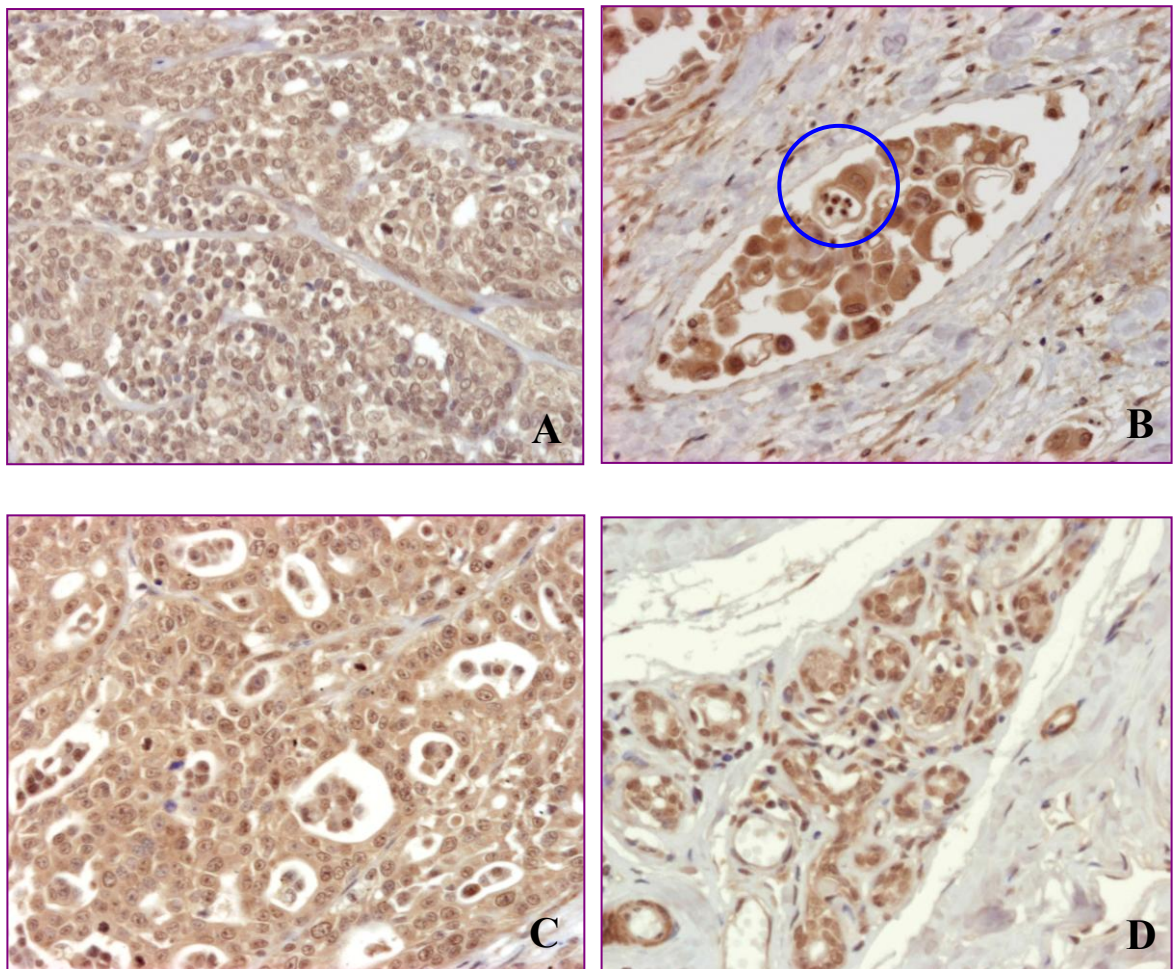


Figura 16. Técnica estreptavidina-biotina-peroxidasa anti-RA (x20). **A)** CI mamario canino positivo. **B)** CI mamario canino positivo. ELC positiva (círculo) como el resto del tumor. **C)** TMM no-CI positivo. **D)** MN positiva.

En la **Tabla 8** se encuentran resumidos los resultados de la inmunotinción de las células epiteliales de los tejidos empleados al marcador del RA.

Tabla 8. Inmunoexpresión del RA en los grupos CI, TMM no-CI y MN.

| Intensidad Grupo | 0 | 1 | 2 | 3 |
|----------------------|-------------|--------------|--------------|--------------|
| CI (n= 22) | 1 (4,5%) | 8 (36,4%) | 4 (18,2%) | 9 (40,9%) |
| TMM no-CI (n= 20) | 2 (10%) | 8 (40%) | 8 (40%) | 2 (10%) |
| MN (n= 4) | 0 (0%) | 2 (50%) | 2 (50%) | 0 (0%) |

Veintiuno de los 22 (95,45%) CI y 16 de los 20 (80%) TMM no-CI se consideraron positivos al RA. Las muestras de MN fueron, también, positivas al RA. El estudio estadístico reveló que no existen diferencias significativas entre grupos con respecto a la positividad ($p=0,493$) y/o intensidad de tinción ($p=0,110$) de RA entre los grupos (CI y TMM no-CI).

1.5. Estudio inmunohistoquímico de marcadores de células endoteliales

Con el fin de marcar las células endoteliales para el posterior recuento de vasos, para determinar si las ELCs y/o las células tumorales de los grupos CI y TMM no-CI presentan inmunoexpresión a determinados marcadores vasculares y para facilitar el diagnóstico de algunos tumores, se realizaron las técnicas de IHQ del Factor von Willebrand, CD31, CD34 y D2-40, en 22 CI y en 20 TMM no-CI. También se realizaron en las muestras (n=4) de MN.

1.5.1. Estudio inmunohistoquímico del Factor von Willebrand

La tinción del marcador de células endoteliales factor von Willebrand, se localizó en el citoplasma de las células endoteliales, tanto sanguíneas como linfáticas. Sin embargo, la positividad vascular fue irregular, puesto que no se tiñeron todos los vasos que estaban presentes en los tejidos. Esta falta de reactividad no se asoció al tamaño o tipo de vaso.

Por otro lado, existió inmunotinción en el citoplasma de algunas células tumorales de los grupos CI y TMM no-CI y en la mama normal e hiperplásica adyacente. Las células neoplásicas que fueron positivas se encontraban tanto en los émbolos tumorales del interior de los vasos, como infiltrando el tejido mamario (**Figura 17**). Los resultados de la inmunoexpresión de vWF en los tumores y en la MN se resumen en la **Tabla 9**.

En general, el estroma tumoral, los fibroblastos y miofibroblastos fueron negativos, aunque la tinción de los fibroblastos y miofibroblastos fue heterogénea dentro de un mismo tejido. Las células del tejido cartilaginoso y óseo fueron también positivas, en ocasiones, a la tinción con vWF.

En 10 de los 22 (45,5%) CI estudiados, se encontraron grupos de células tumorales positivas a vWF. Los demás tumores CI (54,6%) fueron negativos a dicho marcador. Con respecto a las ELCs, éstas mostraron una inmunoeexpresión similar al resto de células tumorales presentes en el tumor (**Figura 17**), a excepción de un caso (**CI 1**) en el que el tumor fue negativo a vWF, pero sin embargo algún grupo aislado de ELCs fueron ligeramente positivas (intensidad 1) en su citoplasma. En el grupo de TMM no-CI, 7 de los 20 (35%) tumores fueron positivos a vWF. Las zonas de mama hiperplásica adyacente a los tumores positivos a vWF, también fueron positivas. Este fenómeno se observó en 9 de 10 (90%) casos de CI y en 3 de 7 (42,9%) casos en TMM no-CI.

Las cuatro muestras de mama normal mostraron positividad citoplasmática con diferente intensidad y generalmente el estroma fue negativo (**Figura 18**).

Tabla 9. Inmunoeexpresión del **vWF** en los grupos CI, TMM no-CI y MN.

| Intensidad Grupo | 0 | 1 | 2 | 3 |
|-----------------------------|---------------|-------------|--------------|--------------|
| CI (n= 22) | 12 (54,5%) | 1 (4,5%) | 3 (13,6%) | 6 (27,3%) |
| TMM no-CI (n= 20) | 13 (65%) | 2 (10%) | 4 (20%) | 1 (5%) |
| MN (n= 4) | 0 (0%) | 1 (25%) | 2 (50%) | 1 (25%) |

Existieron diferencias significativas entre los dos grupos CI y TMM no-CI, siendo mayor la proporción de tumores CI positivos a vWF que los TMM no-CI ($p=0,003$). Sin embargo, al comparar los dos grupos en función de la intensidad de inmunoeexpresión de vWF, no existieron diferencias significativas ($p=0,26$).

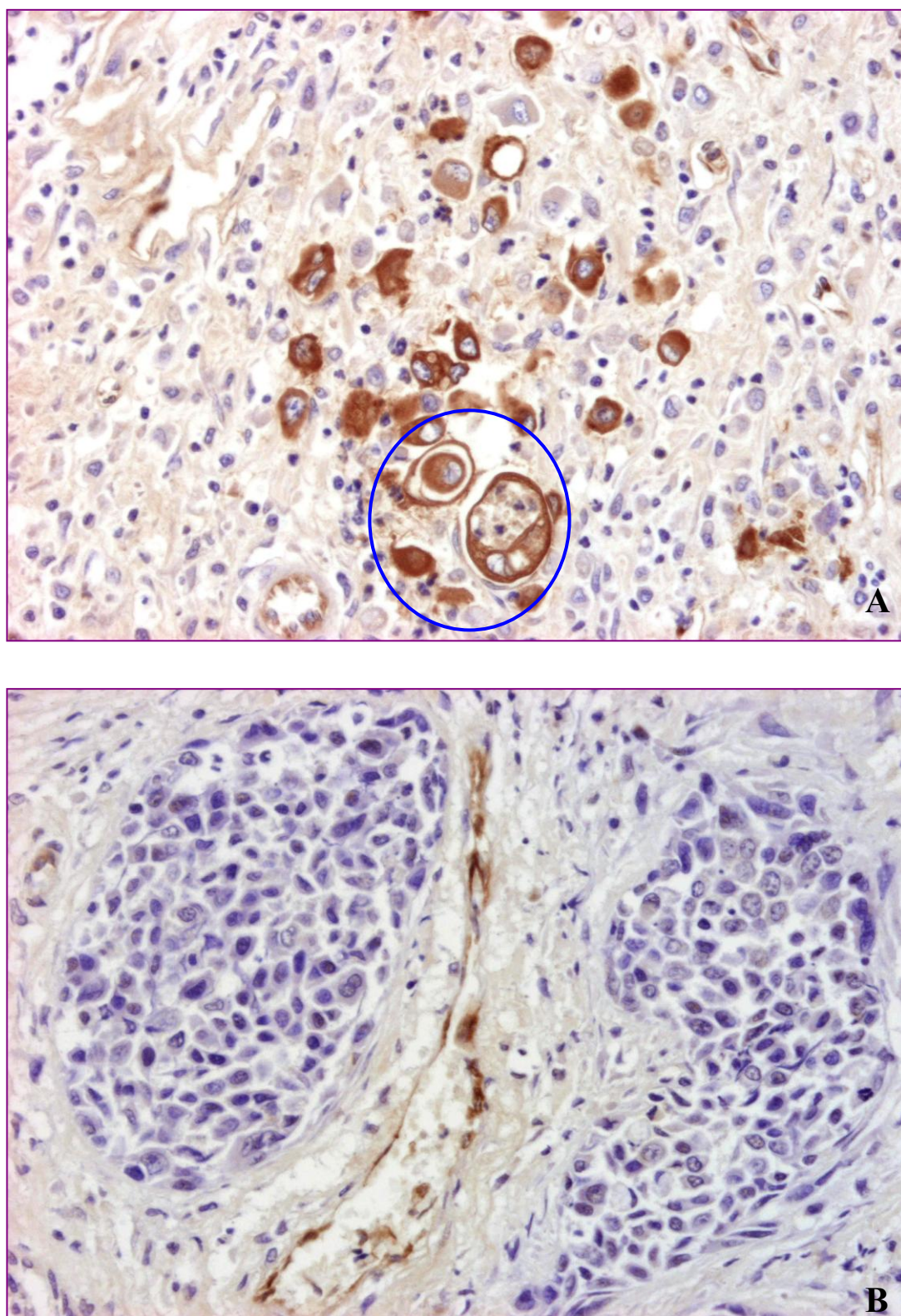


Figura 17. Técnica de estreptavidina-biotina-peroxidasa anti-factor von Willebrand (vWF). CI mamario canino (x20). **A)** Células neoplásicas positivas infiltrando el tejido mamario. ELCs positivas (círculo). **B)** Tumor negativo. Células endoteliales de los vasos positivas.

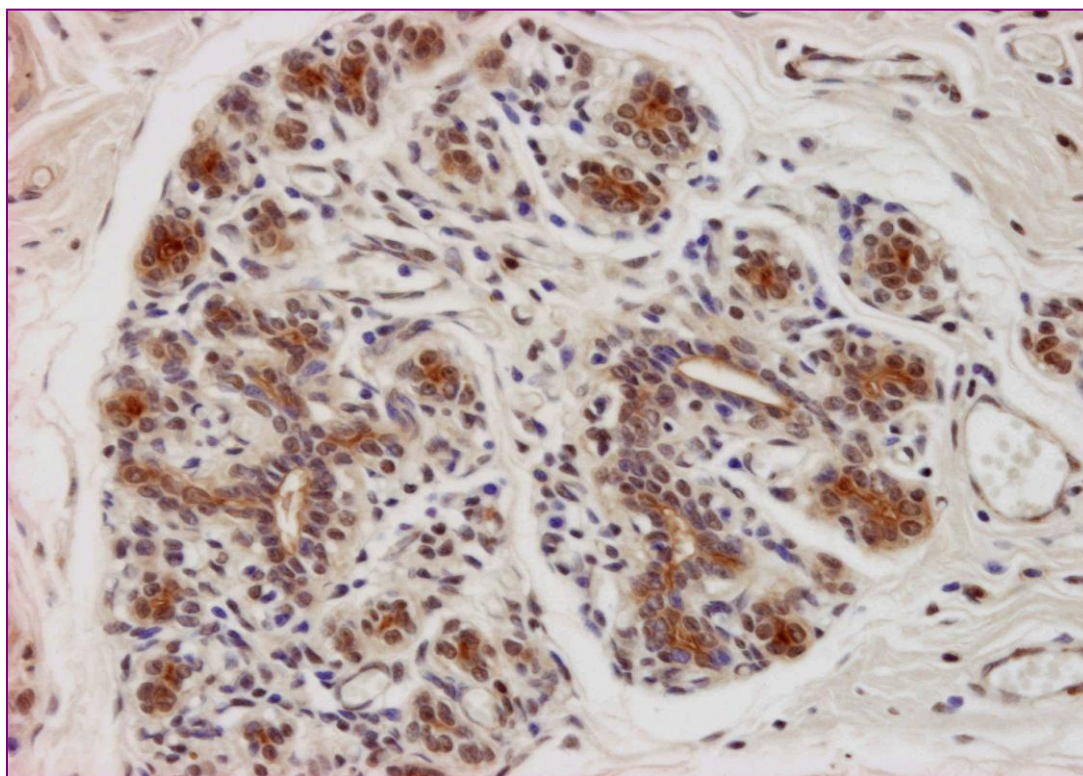


Figura 18. Técnica estreptavidina-biotina-peroxidasa anti-vWF. Mama normal positiva (x20).

1.5.2. Estudio inmunohistoquímico de CD31

Las células endoteliales fueron positivas a la tinción con CD31 (**Figura 19**). La inmunoexpresión fue siempre citoplasmática y se localizó en las células endoteliales de los vasos sanguíneos y linfáticos. A diferencia de lo que observamos con el Factor von Willebrand, el marcador CD31 exhibió una tinción regular y uniforme de todos los vasos que estaban presentes en cada uno de los tejidos. No se observó tinción positiva en otras células normales o tumorales (**Figura 19**). Las ELCs fueron también negativas a excepción del tumor **CI 1**, en el que se apreció alguna ELC aislada con ligera positividad citoplasmática (intensidad 1) a CD31.

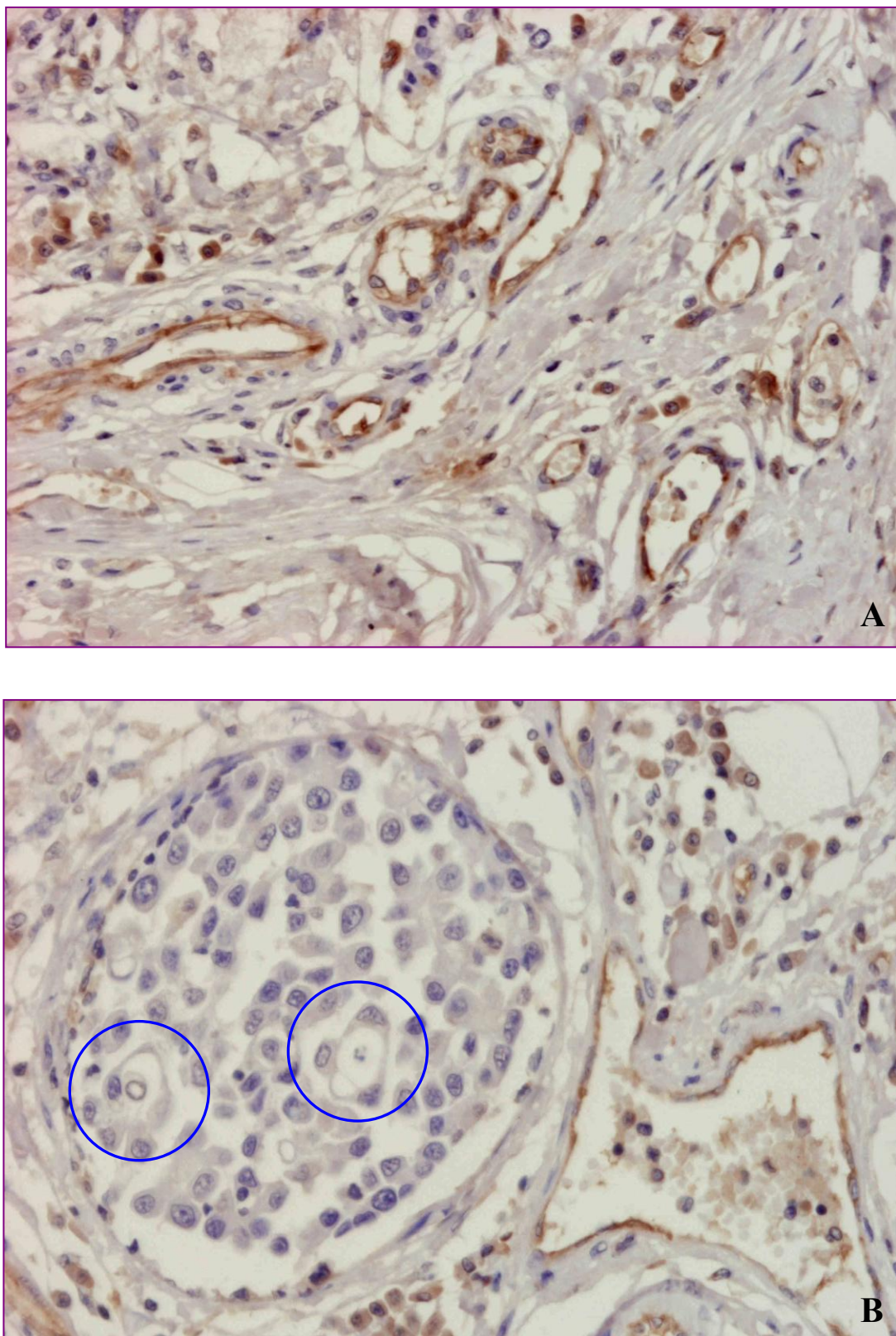


Figura 19. Técnica estreptavidina-biotina-peroxidasa anti-CD31. CI mamario canino (x20). **A)** Células endoteliales de vasos sanguíneos y linfáticos positivas. **B)** Células tumorales negativas. ELCs negativas (círculos). Células endoteliales de un vasos sanguíneo positivas. Tinción inespecífica de células plasmáticas del estroma.

Los resultados de la inmunoexpresión de las células tumorales y de la mama normal, a la tinción con CD31 se encuentran resumidos en la **Tabla 10**.

Tabla 10. Inmunoexpresión de **CD31** en los grupos CI, TMM no-CI y MN.

| Intensidad Grupo | 0 | 1 | 2 | 3 |
|-----------------------------|--------------|-----------|-----------|-----------|
| CI (n= 22) | 22 (100%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 0 (0%) |
| TMM no-CI (n= 20) | 20 (100%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 0 (0%) |
| MN (n= 4) | 4 (100%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 0 (0%) |

1.5.3. Estudio inmunohistoquímico de CD34

La inmunoexpresión de CD34 en 39 tumores mamarios (22 CI y 17 TMM no-CI) y 4 mamas normales de CD34 se observó en el citoplasma de las células endoteliales de los vasos sanguíneos y linfáticos. Sin embargo, la tinción fue marcadamente irregular, de manera que una gran cantidad de células endoteliales de vasos sanguíneos y linfáticos fueron negativas a CD34.

Además de localizarse en las células endoteliales, se observó positividad a CD34 en algunas células tumorales (**Figura 20**). La expresión de CD34 fue heterogénea dentro de una misma muestra tumoral. Los fibroblastos y las células del tejido cartilaginoso y óseo de los tumores mixtos fueron negativos a la tinción con CD34. Los resultados de la inmunoexpresión de CD34 se encuentran resumidos en la **Tabla 11**.

Tabla 11. Inmunoexpresión de **CD34** en los grupos CI, TMM no-CI y MN.

| Intensidad Grupo | 0 | 1 | 2 | 3 |
|-----------------------------|---------------|-------------|--------------|-------------|
| CI (n= 22) | 18 (81,9%) | 2 (9,1%) | 1 (4,5%) | 1 (4,5%) |
| TMM no-CI (n= 17) | 14 (82,3%) | 1 (5,9%) | 2 (11,8%) | 0 (0%) |
| MN (n= 4) | 4 (100%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 0 (0%) |

Cuatro de 22 CI (18,2%) y 3 de 17 (17,6%) TMM no-CI fueron positivos a CD34. Las ELCs fueron negativas en todos los casos. Las células de la MN fueron siempre negativas. No existieron diferencias significativas entre los grupos CI y TMM no-CI con respecto a la inmunoexpresión de CD34 (teniendo en cuenta los casos positivos y negativos ($p=0,96$) y valorando la intensidad ($p=0,67$)), ni entre ambos grupos (CI y TMM no-CI) y el grupo MN.

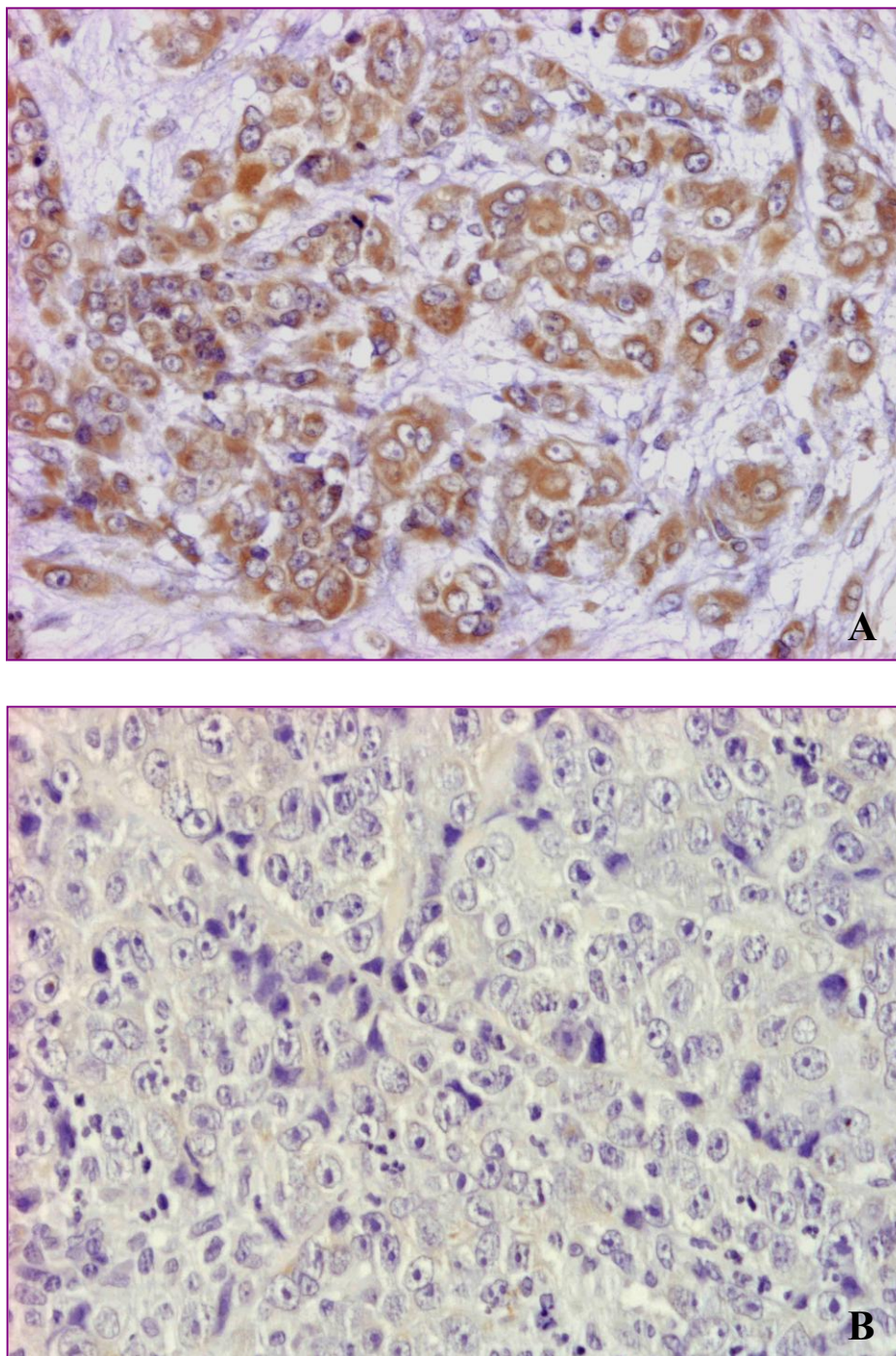


Figura 20. Técnica estreptavidina-biotina-peroxidasa anti-CD34 CI mamario canino (x20). **A)** Células tumorales positivas. **B)** Células tumorales negativas.

1.5.4. Estudio inmunohistoquímico del marcador de células endoteliales linfáticas D2-40

No se encontró inmunoexpresión en ninguno de los 46 tejidos mamarios caninos teñidos con D2-40. Dicho anticuerpo no mostró reactividad cruzada frente al tejido mamario canino. Sin embargo, el control positivo empleado, un tejido procedente de un tumor mamario maligno humano, presentó inmunoexpresión selectiva en las células endoteliales linfáticas.

1.6. Estudio inmunohistoquímico de VEGF-A, VEGF-D y VEGFR-3

1.6.1. Estudio inmunohistoquímico del VEGF –A

La inmunotinción con el factor de crecimiento del endotelio vascular –A (*vascular endothelial growth factor-A*, VEGF-A) fue citoplasmática y heterogénea en de los tejidos tumorales analizados (CI y TMM no-CI). VEGF-A se expresó en el citoplasma de gran parte las células mioepiteliales y/o miofibroblastos que se disponen rodeando los émbolos tumorales, siendo el resto del estroma mayoritariamente negativo. También fueron positivas a VEGF-A algunas células endoteliales sanguíneas, pero no las células endoteliales linfáticas. La tinción endotelial fue irregular, de manera que no todos los vasos sanguíneos presentes en las muestras fueron positivos al marcaje con VEGF-A. Las células cartilaginosas y óseas de los tumores mixtos fueron positivas a VEGF-A.

Las células tumorales de los grupos CI y TMM no-CI mostraron, en general, positividad citoplasmática a la inmunotinción con VEGF-A, aunque se apreció una mayor intensidad de expresión en los CI (**Figura 21**). La inmunoexpresión fue homogénea en todos los tumores. La positividad fue similar tanto en las células que se encontraban en émbolos tumorales en el interior de los vasos, como en las células tumorales que infiltraban el tejido mamario. Las ELCs, mostraron la misma inmunotinción que el resto de células tumorales del tejido en el que se localizaron, observándose una inmunoexpresión moderada o elevada en todos los casos de las ELCs de los CI (**Figura 22**) y ligera en el caso las del TMM no-CI. Las células mamarias normales o hiperplásicas adyacentes fueron negativas.

En la mama normal, la inmunotinción con VEGF-A fue relativamente homogénea, puesto que las células epiteliales fueron negativas en los cuatro casos incluidos y los componentes del estroma fueron mayoritariamente negativos, únicamente fueron positivos

algunos fibroblastos. De la misma manera que ocurrió en los tejidos tumorales, se observó una tinción irregular de las células endoteliales.

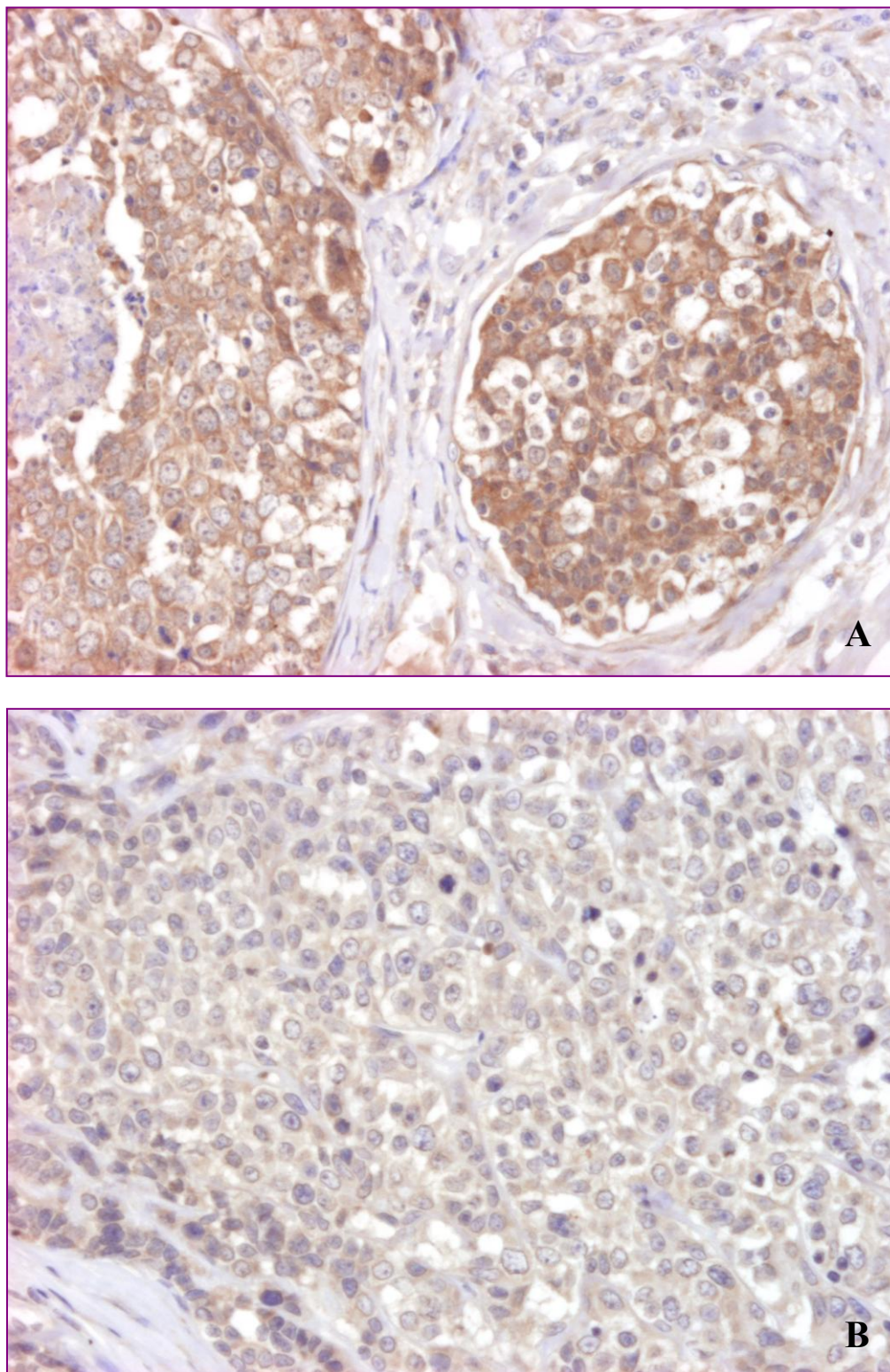


Figura 21. Técnica de estreptavidina-biotina-peroxidasa anti-VEGF-A (x20) **A)** CI mamario canino. Células tumorales positivas. **B)** TMM no-CI. Células tumorales positivas.

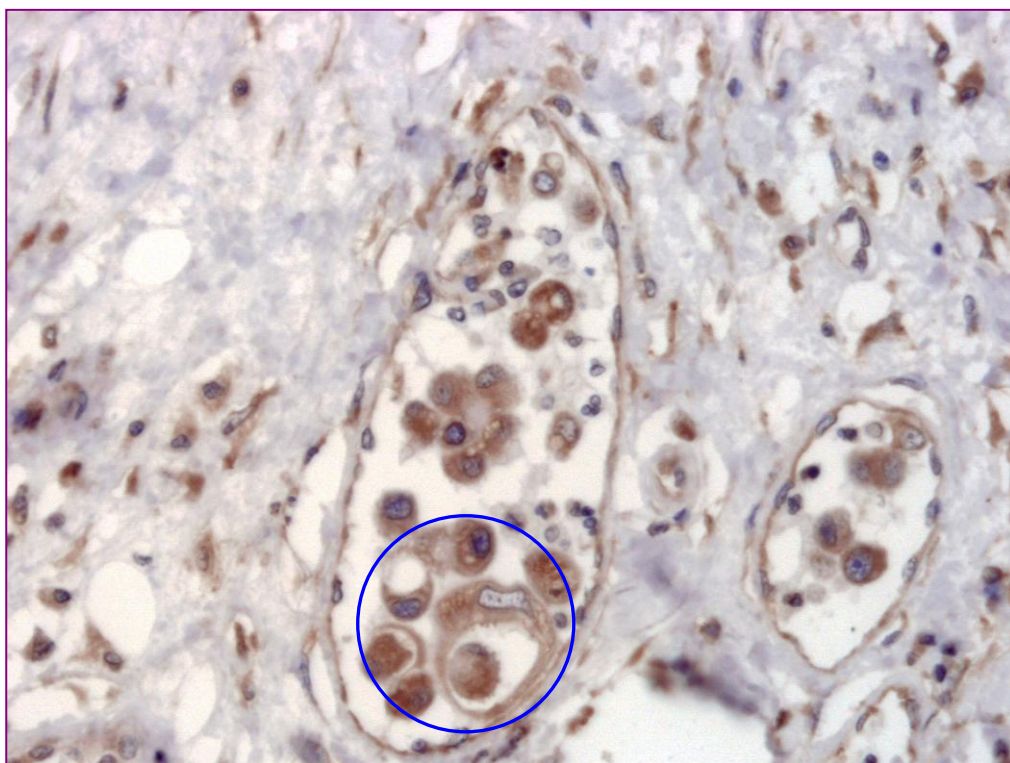


Figura 22. Técnica de estreptavidina-biotina-peroxidasa anti-VEGF-A. CI mamario canino. Émbolo tumoral positivo con ELCs positivas (círculo).

Los resultados obtenidos de la inmunotinción con VEGF-A, en las muestras de los grupos CI y TMM no-CI y MN, se encuentran resumidos en la **Tabla 12**.

Tabla 12. Inmunoexpresión del VEGF-A en los grupos CI, TMM no-CI y MN.

| Intensidad Grupo | 0 | 1 | 2 | 3 |
|----------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| CI (n= 22) | 3 (13,6%) | 6 (27,3%) | 9 (40,9%) | 4 (18,2%) |
| TMM no-CI (n= 20) | 10 (50%) | 8 (40%) | 2 (10%) | 0 (0%) |
| MN (n= 4) | 4 (100%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 0 (0%) |

Diecinueve 19 de los 22 (86,4%) CI y 13 de los 20 (65%) TMM no-CI fueron positivos a VEGF-A. Existen diferencias significativas entre los dos grupos con respecto a la inmunoexpresión de VEGF-A. El grupo CI presenta una frecuencia ($p=0,011$) e intensidad ($p= 0,006$) de expresión de VEGF-A significativamente mayor que los TMM no-CI. Las muestras de MN fueron negativas.

1.6.2. Estudio inmunohistoquímico del VEGF-D

Se tiñeron 41 tumores mamarios (21 CI y 20 TMM no-CI) con el anticuerpo policlonal H-144 anti-factor de crecimiento del endotelio vascular -D (*vascular endothelial growth factor-D*, VEGF-D). En todos ellos se observó que la inmunotinción fue siempre citoplasmática. Se localizó immunoexpresión en la mayoría de las células del estroma tumoral. Las células endoteliales de los vasos sanguíneos y linfáticos mostraron una tinción uniforme, tiñendo gran cantidad de los vasos sanguíneos y linfáticos que se encontraban presentes en el tejido. Por el contrario, las células de los tejidos cartilaginoso y óseo fueron negativas a la tinción con dicho marcador.

Las células tumorales, mioepiteliales y miofibroblastos mostraron una tinción de intensidad homogénea dentro de cada muestra tumoral tanto en el grupo CI como en el de TMM no-CI. La inmunotinción fue granular y localizada en el citoplasma de las células de 7 de los 21 CI (33,3%). Esta tinción focal se presentó como una formación de aspecto redondeado claramente diferenciada del resto del citoplasma. En el resto de los CI la positividad fue difusa en el citoplasma (**Figura 23**). En las ELCs, la immunoexpresión fue similar a la observada en el resto de las células tumorales del tejido en el que se encontraron y fueron positivas en todos los casos. En el grupo TMM no-CI, la tinción fue homogénea en todas las células tumorales y difusa en el citoplasma, sin apreciarse formaciones redondeadas, como en algunos CI. La mama normal o hiperplásica adyacente a alguno de los tumores de ambos grupos, fueron negativas a la tinción con VEGF-D.

En la MN, las células del estroma y las células endoteliales de los vasos sanguíneos y linfáticos fueron positivas. Las células epiteliales y mioepiteliales fueron negativas.

El resumen de los resultados de la immunoexpresión de los CI y TMM no-CI y de la MN, para el marcador VEGF-D, se encuentran resumidos en la **Tabla 13**.

Tabla 13. Immunoexpresión del VEGF-D en los grupos CI, TMM no-CI y MN.

| Intensidad Grupo | 0 | 1 | 2 | 3 |
|----------------------|-------------|--------------|---------------|--------------|
| CI (n= 21) | 0 (0%) | 6 (28,6%) | 12 (57,1%) | 3 (14,3%) |
| TMM no-CI (n= 20) | 8 (40%) | 11 (55%) | 1 (5%) | 0 (0%) |
| MN (n= 4) | 4 (100%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 0 (0%) |

Todos los CI incluidos (100%) fueron positivos a VEGF-D. Dentro del grupo TMM no-CI, 12 de 20 (60%) tumores fueron positivos a este marcador. La positividad ($p=0,001$) y la intensidad de inmunoexpresión del grupo CI fue significativamente mayor que la del grupo TMM no-CI ($p=0,000$), para el VEGF-D.

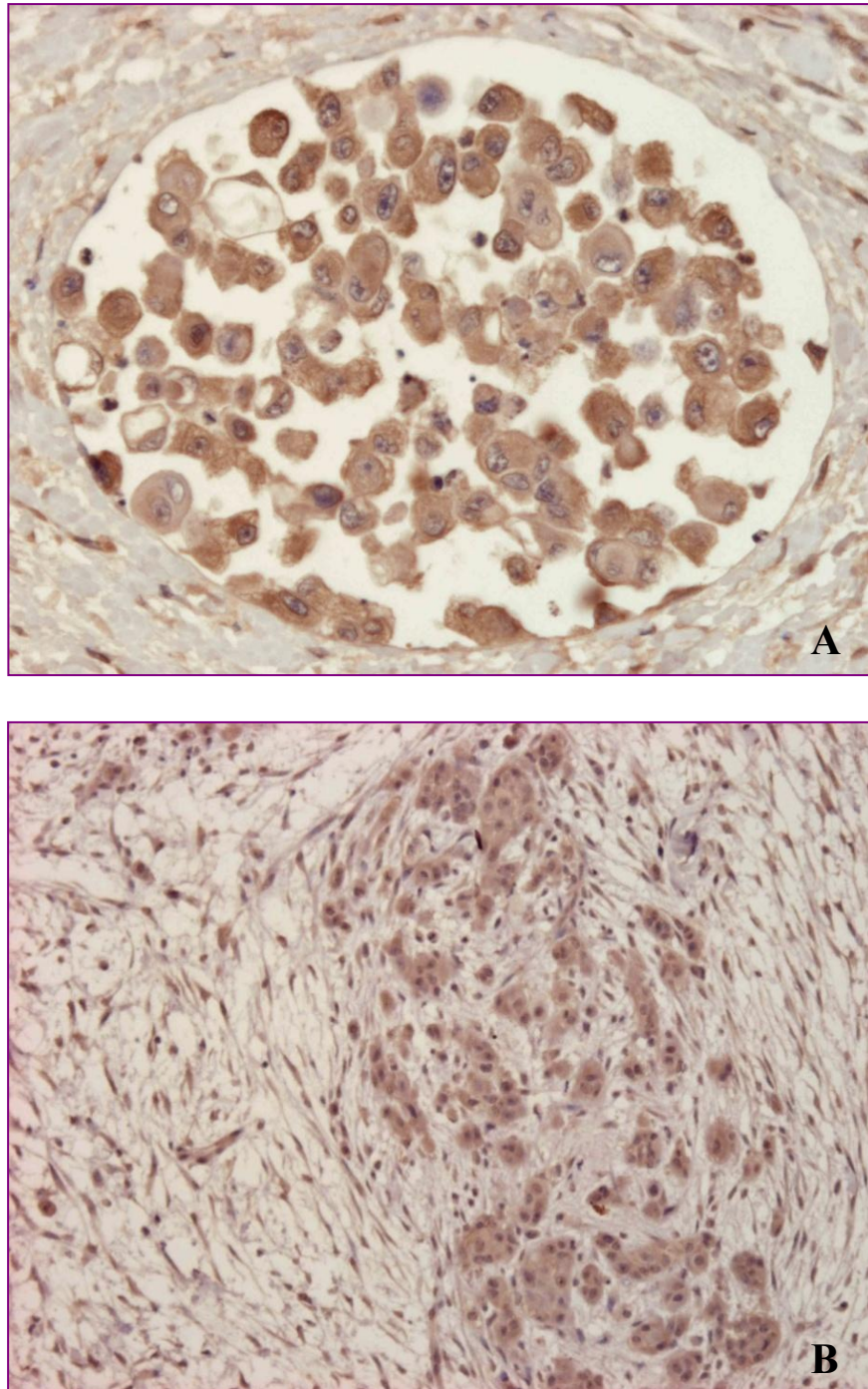


Figura 23. Técnica estreptavidina-biotina-peroxidasa anti-VEGF-D. CI mamario canino. **A)** Células tumorales de un émbolo positivas. **B)** Células tumorales infiltrando positivas.

1.6.3. Estudio inmunohistoquímico del VEGFR-3

De los 42 tejidos tumorales teñidos y 4 mamas normales, 2 CI y 1 TMM no-CI fueron excluidos en la valoración de la inmunoeexpresión del receptor 3 del factor de crecimiento del endotelio vascular (*vascular endothelial growth factor receptor 3*, VEGFR-3), debido a que el tejido fue muy sensible al tratamiento con tripsina y calor y se destruyó durante el desarrollo de la técnica inmunohistoquímica. La inmunoeexpresión de VEGFR-3 fue siempre citoplasmática en el resto de tejidos que pudieron ser evaluados.

En los tejidos tumorales (CI y TMM no-CI), la inmunotinción del anticuerpo anti-VEGFR-3 fue homogéneamente positiva y de intensidad baja en la mayor parte de las células del estroma tumoral. En las células endoteliales, la tinción fue irregular, no apreciándose positividad en todos los vasos presentes y con una mayor respuesta positiva de los vasos linfáticos con respecto a los sanguíneos. Los tejidos cartilaginosos, óseos y la mama normal o hiperplásica presentes en alguna de las muestras tumorales, fueron negativos a la tinción con VEGFR-3.

En las células tumorales la tinción fue homogénea y difusa en el citoplasma celular, tanto del grupo CI como TMM no-CI. La tinción fue negativa o de intensidad leve o moderada, pero en ninguno de los casos se observó una intensidad de inmunoeexpresión fuerte (**Figura 24**). De igual manera que lo observado para VEGF-D, en 2 de los 20 casos (10%) de CI, la inmunotinción se encontró de forma focal formando una especie de agregado redondeado claramente diferenciado del resto del citoplasma y con tinción granular en el interior de éste. Las ELCs presentes en alguno de los casos de CI, presentaron el mismo patrón de inmunotinción que el resto de células tumorales dentro del tejido en el que se localizaron.

Las muestras de mama normal presentaron un estroma negativo y una tinción de células endoteliales irregular, como ocurría en los tumores. La inmunotinción de las células epiteliales y mioepiteliales de la mama normal fue negativa en 3 de las 4 (75%) muestras. En una sola muestra, se apreció una leve tinción homogénea.

Los resultados de la tinción inmunohistoquímica de las células tumorales (CI y TMM no-CI) y en las muestras de mama normal, con el anticuerpo policlonal FTL-4 VEGFR-3 se encuentran resumidos en la **Tabla 14**.

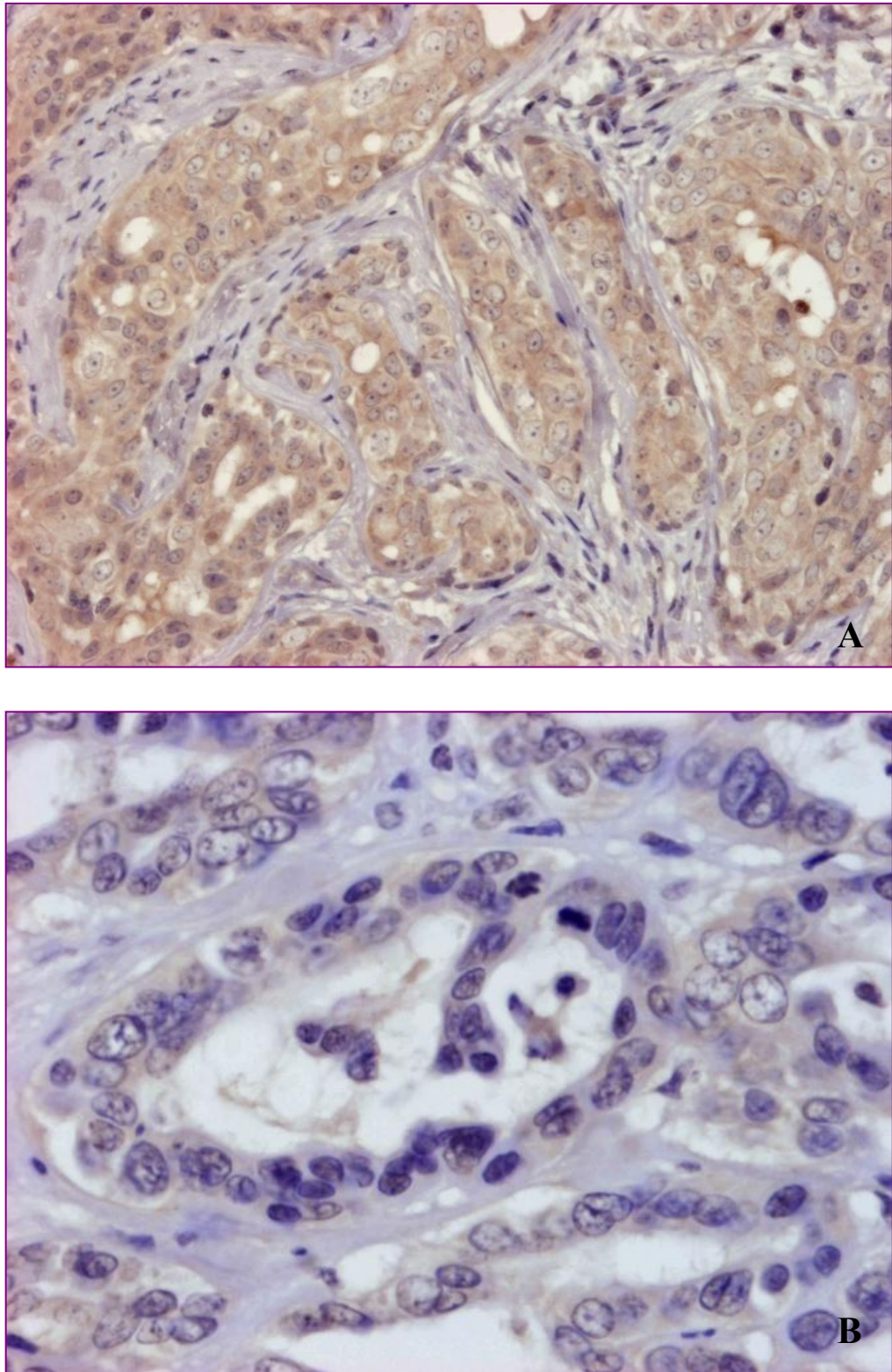


Figura 24. Técnica de estreptavidina-biotina-peroxidasa anti-VEGFR-3. **A)** CI mamario canino. Células tumorales positivas (x20). **B)** TMM no-CI. Células tumorales positivas (x40).

Tabla 14. Inmunoexpresión del **VEGFR-3** en los grupos CI, TMM no-CI y MN.

| Intensidad Grupo | 0 | 1 | 2 | 3 |
|-----------------------------|--------------|--------------|--------------|-----------|
| CI (n= 20) | 5 (25%) | 9 (45%) | 6 (30%) | 0 (0%) |
| TMM no-CI (n= 19) | 9 (47,4%) | 8 (32,1%) | 2 (10,5%) | 0 (0%) |
| MN (n= 4) | 3 (75%) | 1 (25%) | 0 (0%) | 0 (0%) |

Quince de los 20 (75%) CI y 10 de 19 (52,6%) TMM no-CI fueron positivos a VEGFR-3. No existen diferencias significativas entre los grupos CI y TMM no-CI con respecto al índice de positividad ($p=0,146$), ni a la intensidad de inmunoexpresión ($p=0,204$) a VEGFR-3.

1.7. Estudio inmunohistoquímico de COX-2

Se realizó la tinción inmunohistoquímica de 41 tumores mamarios (21 CI y 20 TMM no-CI) con el anticuerpo monoclonal N-20 anti-ciclooxygenasa-2 (COX-2). La inmunoexpresión en las células tumorales fue marcadamente heterogénea en las muestras y localizada siempre en el citoplasma celular. El estroma tumoral fue negativo, excepto los miofibroblastos que mostraron una positividad heterogénea en algunos tumores. Las células endoteliales de los vasos sanguíneos y linfáticos fueron negativas, excepto algunas células endoteliales aisladas que fueron positivas, tratándose generalmente de células endoteliales linfáticas. Las células de los tejidos cartilaginoso y óseo de los tumores mixtos fueron positivas a la tinción de COX-2.

En los carcinomas inflamatorios, las células que se apreciaron con intensidad citoplasmática más intensa fueron aquellas células tumorales altamente malignas que se encontraban aisladas infiltrando el tejido mamario o en los émbolos tumorales (**Figura 25 y 26**). Además, esta inmunotinción fuerte a COX-2 fue también evidente en las células ELCs (**Figura 26**). En el grupo de TMM no-CI, también se tiñeron las células más malignas infiltrantes y en el interior de émbolos, pero en este grupo la intensidad fue generalmente leve o moderada, siendo fuerte en un único caso (**Figura 25**).

En el grupo de MN no se encontró respuesta positiva en ningún tipo celular presente en los tejidos incluidos, tanto el estroma como las células epiteliales y mioepiteliales fueron negativas a la tinción con COX-2.

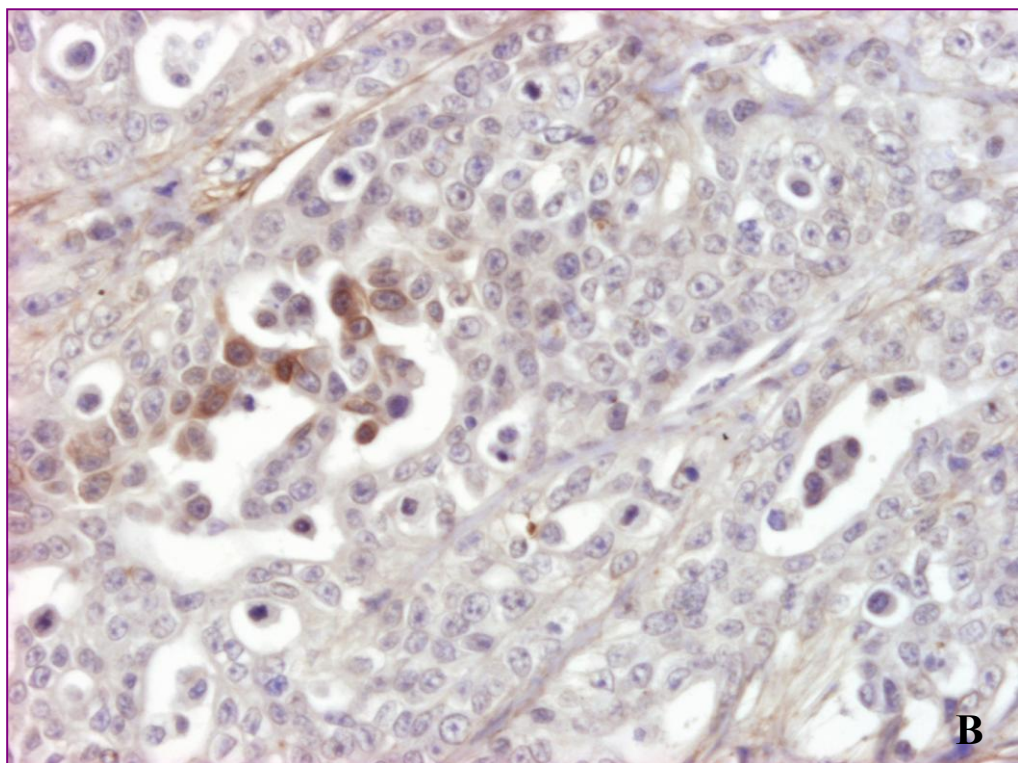
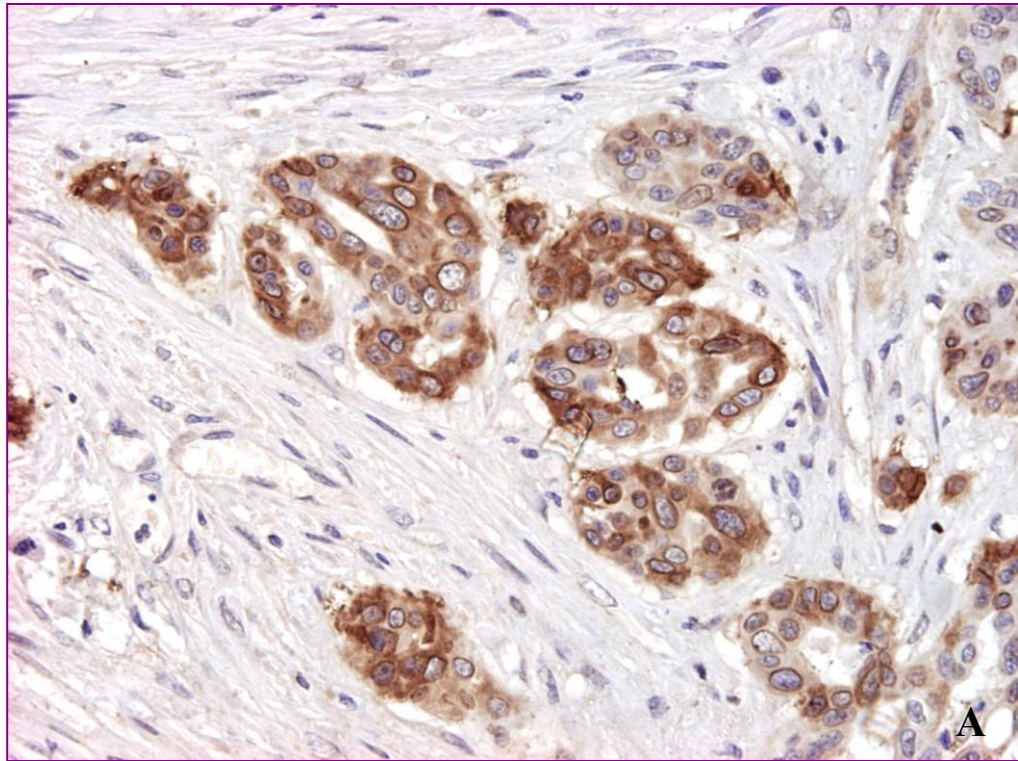


Figura 25. Técnica de estreptavidina-biotina-peroxidasa anti-COX-2 (x20). **A)** CI mamario canino. Células tumorales positivas. **B)** TMM no-CI. Células tumorales positivas.

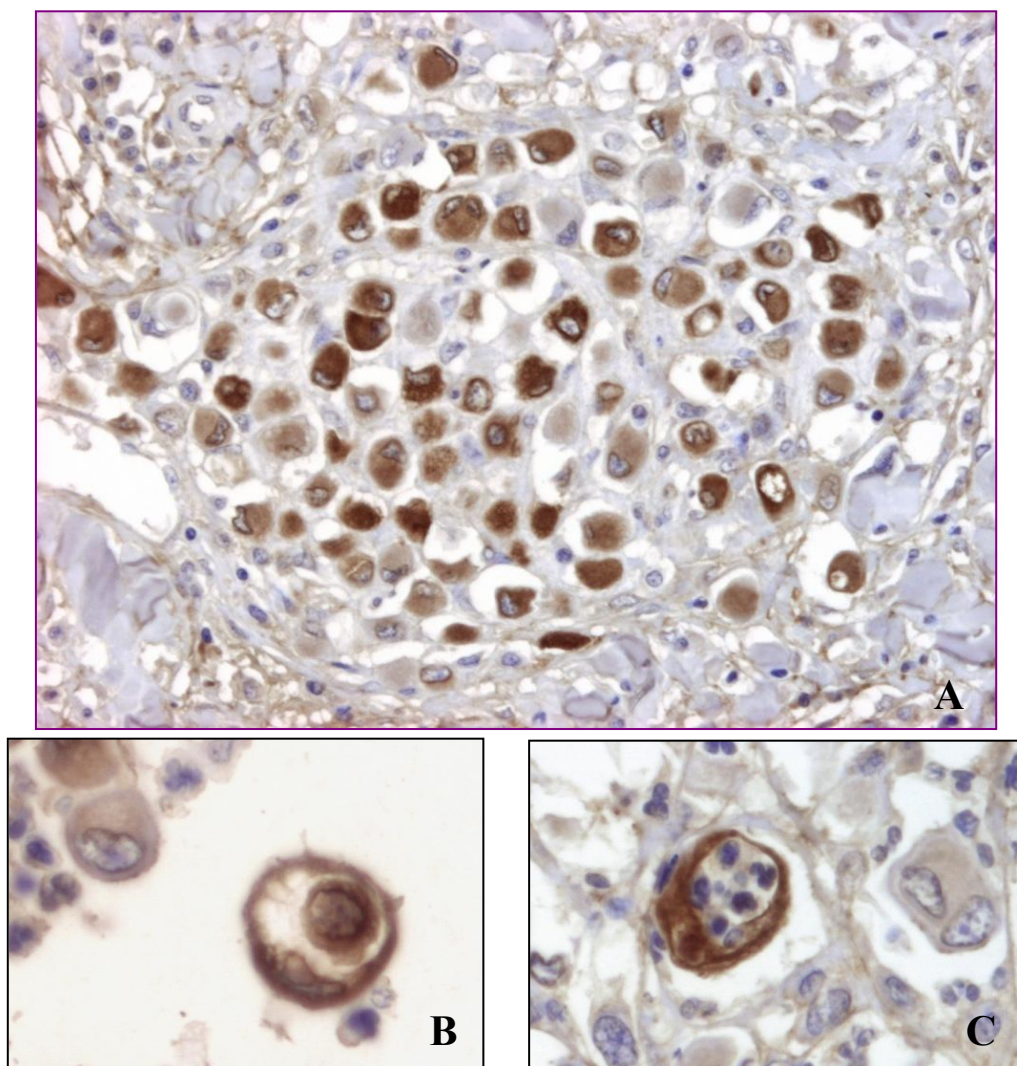


Figura 26. Técnica de estreptavidina-biotina-peroxidasa anti-COX-2. CI mamario canino. **A)** Células tumorales infiltrando positivas (x20). **B) y C)** Detalle de ELCs positivas con células en su interior (x40).

En la **Tabla 15** se encuentran resumidos los resultados de la tinción inmunohistoquímica de los grupos CI, TMM no-CI y MN.

Tabla 15. Inmunoexpresión de **COX-2** en los grupos CI, TMM no-CI y MN.

| Intensidad Grupo | 0 | 1 | 2 | 3 |
|----------------------|-------------|--------------|------------|--------------|
| CI (n= 21) | 2 (9,5%) | 6 (28,6%) | 4 (19%) | 9 (42,9%) |
| TMM no-CI (n= 20) | 3 (15%) | 9 (45%) | 7 (35%) | 1 (5%) |
| MN (n= 4) | 4 (100%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 0 (0%) |

Diecinueve de los 21 CI teñidos (90,47%), y 16 de los 20 (80%) TMM no-CI empleados, fueron positivos a COX-2. No existieron diferencias significativas entre CI y TMM no-CI en cuanto al número de tumores positivos a COX-2 ($p=0,592$); sin embargo, la inmunotinción de COX-2 en el grupo CI fue significativamente mayor que en el grupo TMM no-CI ($p=0,046$), considerando el porcentaje de células teñidas y la intensidad de inmunoeexpresión.

1.8. Características inmunohistoquímicas de las ELCs

Los resultados de la valoración inmunohistoquímica de las ELCs para los diferentes marcadores se resumen en la **Tabla 16**.

Tabla 16. Características inmunohistoquímicas de las ELCs.

| Intensidad Grupo | 0 | 1 | 2 | 3 |
|---------------------|---------------|---------------|---------------|--------------|
| Re alfa | 6 (75%) | 0 (0%) | 2* (25%) | 0 (0%) |
| RE beta | 0 (0%) | 0 (0%) | 6* (75%) | 2 (25%) |
| RP | 1 (12,5%) | 1* (12,5%) | 2 (25%) | 4 (50%) |
| RA | 1 (12,5%) | 1 (12,5%) | 2* (25%) | 4 (50%) |
| vWF | 1 (12,5%) | 1 (12,5%) | 2* (25%) | 4 (50%) |
| CD31 | 7* (87,5%) | 1 (12,5%) | 0 (0%) | 0 (0%) |
| CD34 | 8* (100%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 0 (0%) |
| VEGF-A | 0 (0%) | 1* (12,5%) | 5 (62,5%) | 2 (25%) |
| VEGF-D | 0 (0%) | 2* (25%) | 4 (50%) | 2 (25%) |
| VEGFR-3 | 2* (28,6%) | 0 (0%) | 5 (71,4%) | 0 (0%) |
| COX-2 | 0 (0%) | 0 (0%) | 1* (12,5%) | 7 (87,5%) |

*Incluido el caso TMM 8.

1.9. Estudio de proliferación tumoral. Índice de Ki-67

Mediante la detección inmunohistoquímica del factor de proliferación celular Ki-67, se estableció el porcentaje de proliferación celular de cada una de las muestras tumorales y de mama normal incluidas en el estudio. De los 42 tejidos tumorales y 4 tejidos procedentes de mama normal que se tiñeron con el anticuerpo monoclonal MIB1 Ki-67, se encontró reactividad en todos ellos, excepto en 6 CI (CI 6, CI 8, CI 9, CI 16, CI 18, CI 22) y en 2 TMM no-CI (TMM 3 y TMM 10). En todos los tumores que mostraron reactividad, la inmunotinción fue siempre nuclear. Los resultados por grupos, en cuanto a media de % de Ki-67, desviación estándar y valores máximos y mínimos están descritos en la **Tabla 17**.

Tabla 17. Índice de proliferación Ki-67 en los grupos CI, TMM no-CI y MN.

| | Media | Mediana | Desv. Estándar | Máximo | Mínimo |
|-----------------------------|-------|---------|-------------------|--------|--------|
| CI (n=16) | 37,64 | 38,49 | 11,13 | 58,47 | 21,13 |
| TMM no-CI (n=18) | 30,18 | 32,19 | 12,83 | 48,09 | 8,44 |
| MN (n=4) | 2,61 | 2,19 | 1,52 | 4,80 | 1,28 |

No existieron diferencias significativas ($p=0,081$) en cuanto a porcentaje de proliferación tumoral entre los tumores del grupo CI con respecto a los del grupo TMM no-CI; aunque sí existió una proliferación significativamente mayor en los grupos tumorales que en el grupo de MN.

1.10. Estudio de densidad y proliferación vascular

1.10.1. Estudio de densidad microvascular (DMV)

Mediante el uso de la técnica IHQ de CD31 se realizó un conteo de los microvasos (sanguíneos y linfáticos) marcados en cada muestra, para determinar la densidad microvascular (DMV).

Los microvasos, tanto sanguíneos como linfáticos, presentes en los tejidos tumorales (CI y TMM no-CI) se encontraron frecuentemente en la zona marginal del tumor, siendo pequeña la cantidad de vasos observados en la zona intratumoral. En

relación con este hecho, a medida que el área tumoral fue más sólida, el número de microvasos existentes en la zona intratumoral descendía.

En la MN, los vasos se encontraban mayoritariamente localizados rodeando los acinis glandulares mamarios.

Los resultados del estudio de DMV en los grupos CI, TMM no-CI y MN, se encuentran resumidos en la **Tabla 18**.

Tabla 18. Densidad microvascular (DMV) en los grupos CI, TMM no-CI y MN.

| | Media | Mediana | Desv. Estándar | Máximo | Mínimo |
|----------------------------|-------|---------|-------------------|--------|--------|
| CI (n=22) | 16,04 | 14,80 | 5,38 | 29,10 | 6,70 |
| TMM no-CI (n=20) | 11,84 | 12,20 | 4,10 | 18,10 | 5,10 |
| MN (n=4) | 4,9 | 4,75 | 0,59 | 4,40 | 5,70 |

Los tumores CI contienen una densidad microvascular significativamente mayor que los tumores del grupo TMM no-CI ($p=0,010$) y que todos estos contenían mayor cantidad de vasos con respecto a la mama normal.

1.10.2. Estudio de proliferación de vasos linfáticos

Para determinar el porcentaje de proliferación de los vasos linfáticos se ha utilizado el anticuerpo monoclonal MIB1 Ki-67 y se ha realizado el conteo del porcentaje de células endoteliales linfáticas que fueron positivas en los tejidos empleados (**Figura 27**). De los 42 tejidos tumorales y los 4 procedentes de mamas normales, no se pudo realizar la determinación del LV Ki-67 índice en 6 casos de CI (**CI 6, CI 8, CI 9, CI 16, CI 18, CI 22**) y en 2 TMM no-CI (**TMM 3, TMM 10**), debido a que dichas muestras no presentaron reactividad para el anticuerpo anti-Ki-67. El LV Ki-67 índice, para cada uno de los grupos (CI, TMM no-CI y MN), se encuentra resumido en la **Tabla 19**.

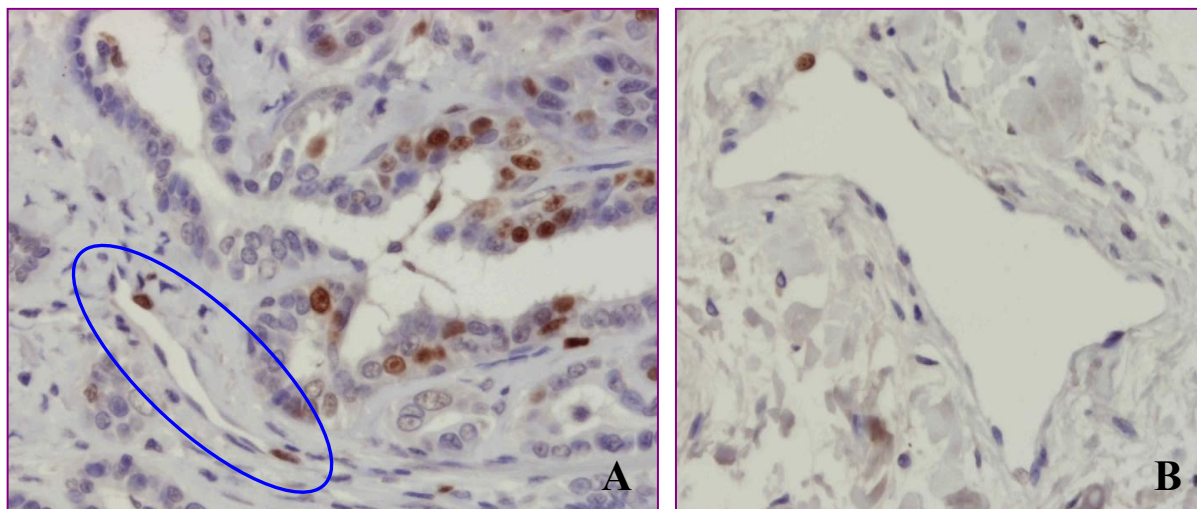


Figura 27. Técnica de estreptavidina-biotina-peroxidasa Ki-67. Proliferación de vasos linfáticos (LV Ki-67 índice) (x40). **A)** Vaso linfático (círculo) con 2 células endoteliales positivas. **B)** Vaso linfático con 1 célula endotelial positiva.

Tabla 19. Proliferación vascular linfática (LV Ki-67 índice) en los grupos CI, TMM no-CI y MN.

| | Media | Mediana | Desv. Estándar | Valor Máximo | Valor Mínimo |
|-----------------------------|-------|---------|-------------------|-----------------|-----------------|
| CI (n=16) | 15,21 | 15,87 | 9,68 | 40,66 | 1,82 |
| TMM no-CI (n=18) | 8,34 | 7,62 | 7,11 | 27,08 | 0,00 |
| MN (n=4) | 0,23 | 0,00 | 0,47 | 0,94 | 0,00 |

Mediante el estudio estadístico se comprobó que el índice de proliferación de vasos linfáticos (LV Ki-67 índice) fue significativamente mayor en los CI con respecto a los del grupo TMM no-CI ($p=0,028$) y de éstos con respecto a los tejidos mamarios normales.

1.11. Estudio de microscopía electrónica de transmisión

El estudio mediante microscopía electrónica de la presencia de células tumorales semejantes a endoteliales del mimetismo vascular (ELCs) se realizó en los casos de **CI 1, CI 3, CI 9, CI 13, y CI 17.**

No se observaron cuerpos de Weibel-Palade en las ELCs, mientras que sí se observaron en las células de endoteliales normales. Las ELCs se caracterizaron por presentar un núcleo de gran tamaño, con nucléolo o nucléolos evidentes. Su citoplasma era escaso y con gran cantidad de retículo endoplásmico rugoso, ribosomas y lisosomas, y mitocondrias en menor número. En las ELCs aisladas, existen uno o varios huecos en el citoplasma rodeados por membrana citoplasmática. Estas oquedades no contienen lípidos y pueden estar ocupadas por células tumorales, células sanguíneas (frecuentes neutrófilos y linfocitos) o células degeneradas. Todas estas estructuras aparecen libres sin localizarse en el interior de una vacuola (**Figuras 28, 29, 30 y 31**). Cuando las ELCs se encuentran unidas formando un canal, éstas se unen mediante desmosomas (**Figuras 31 y 32**).



Figura 28. CI mamario canino. Imagen ultraestructural de una ELC con núcleo grande, nucléolo evidente y con restos de células degeneradas en el interior del canal que forma (x4000).

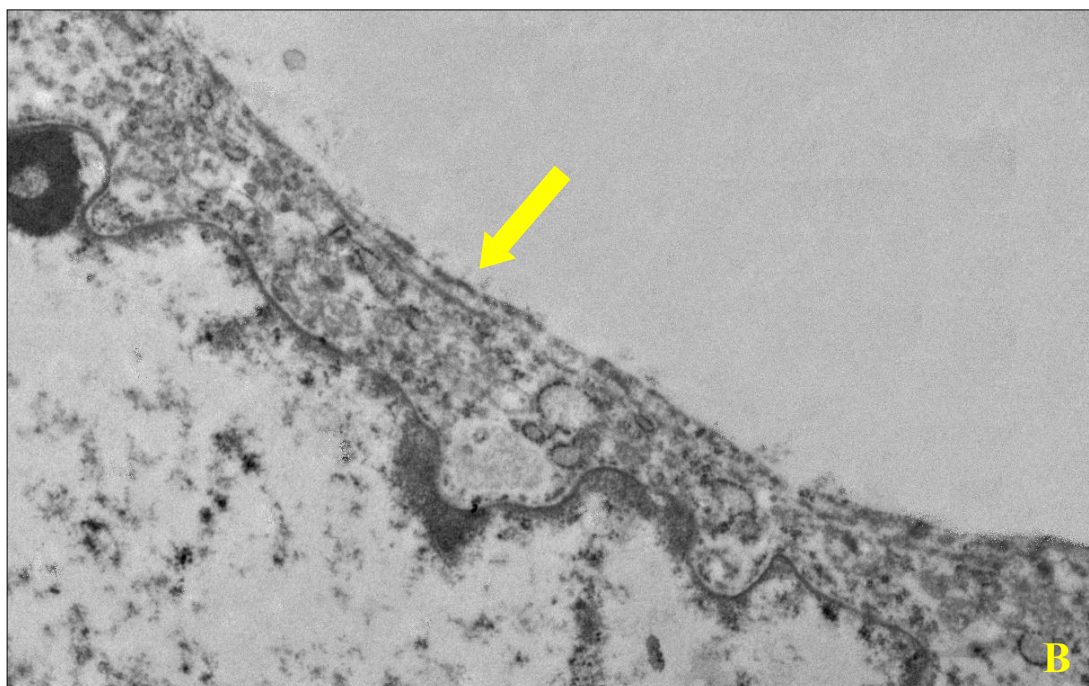
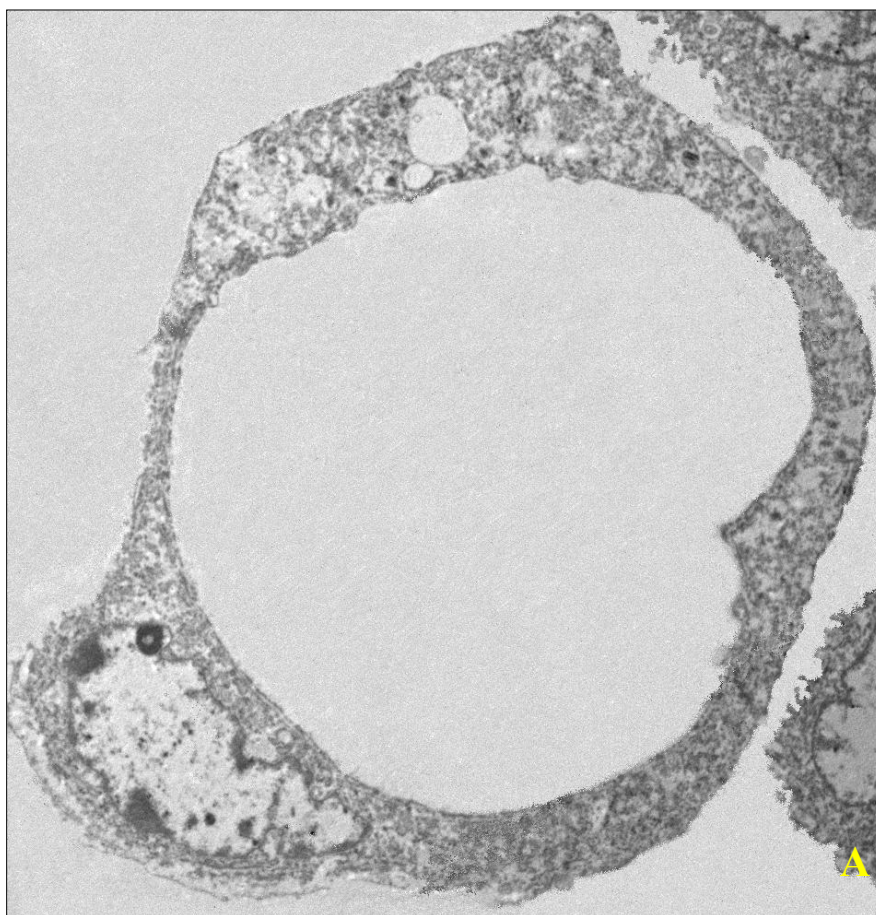


Figura 29. CI mamario canino. Imagen ultraestructural de una ELC. **A)** ELC con núcleo grande y nucléolos evidentes, formando un canal en su interior (x4000). **B)** Detalle de la membrana citoplásmica (flecha) que se encuentra rodeando el canal formado en el interior de la ELC, (x15000).

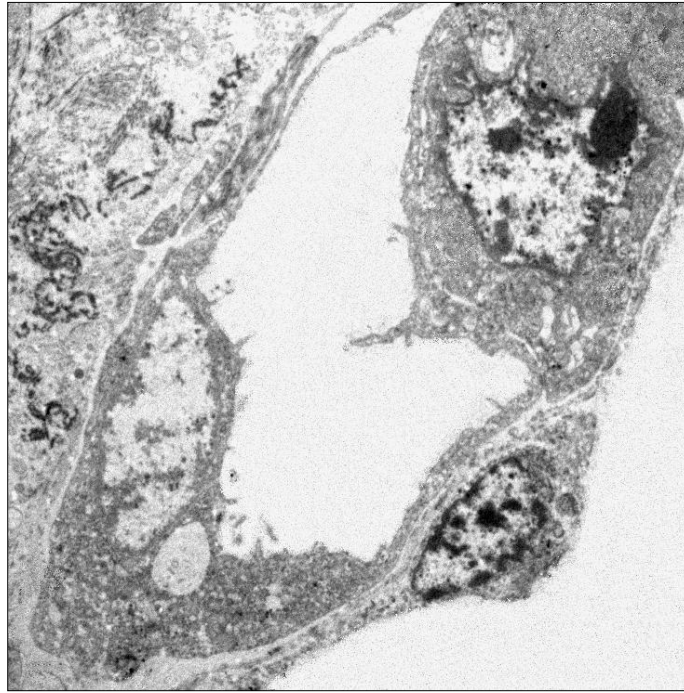


Figura 30. CI mamario canino. Imagen ultraestructural de una ELC con núcleo grande y nucléolo evidente y formando un canal en su interior (x4000).

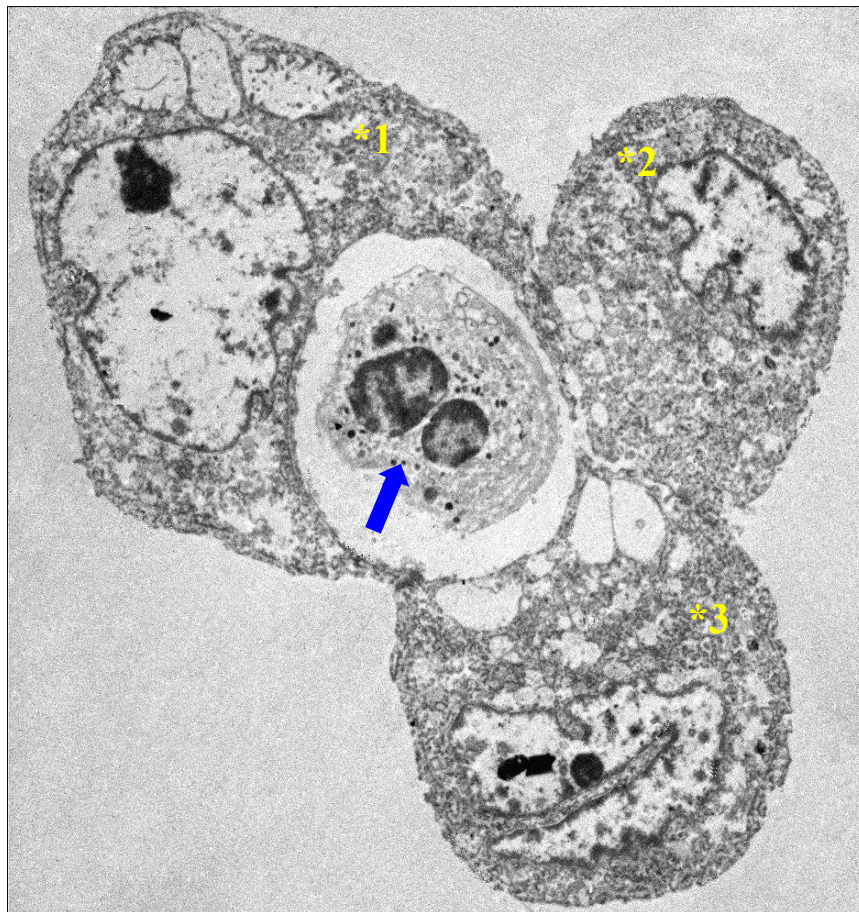
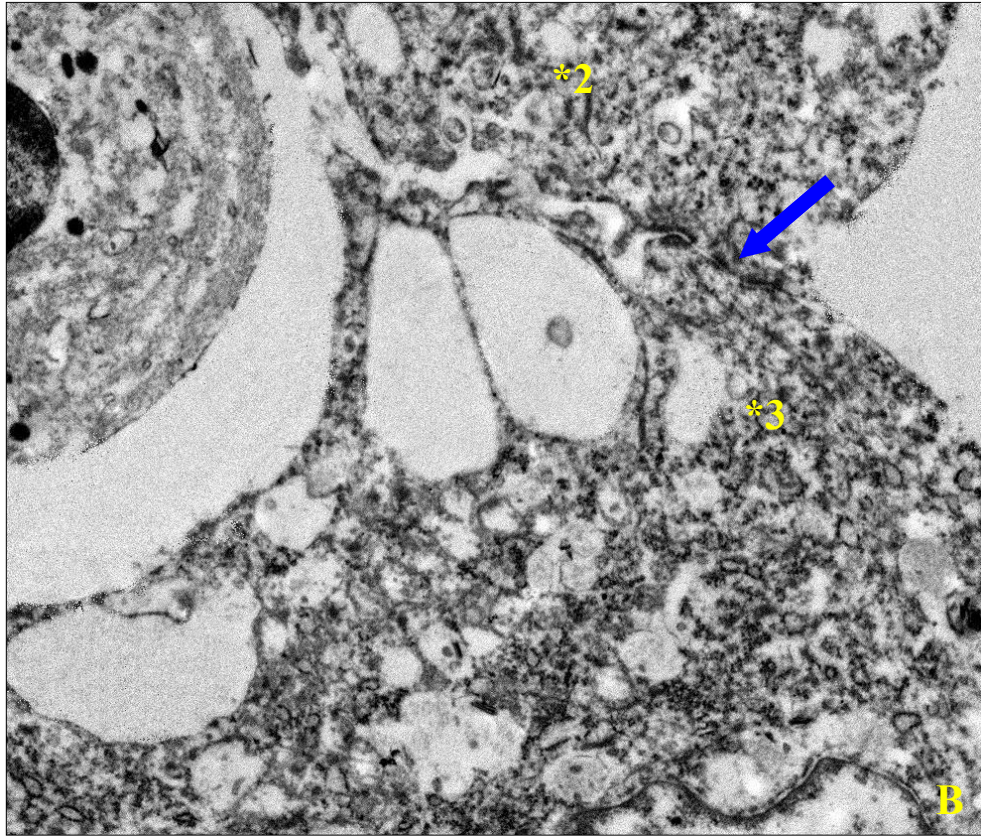
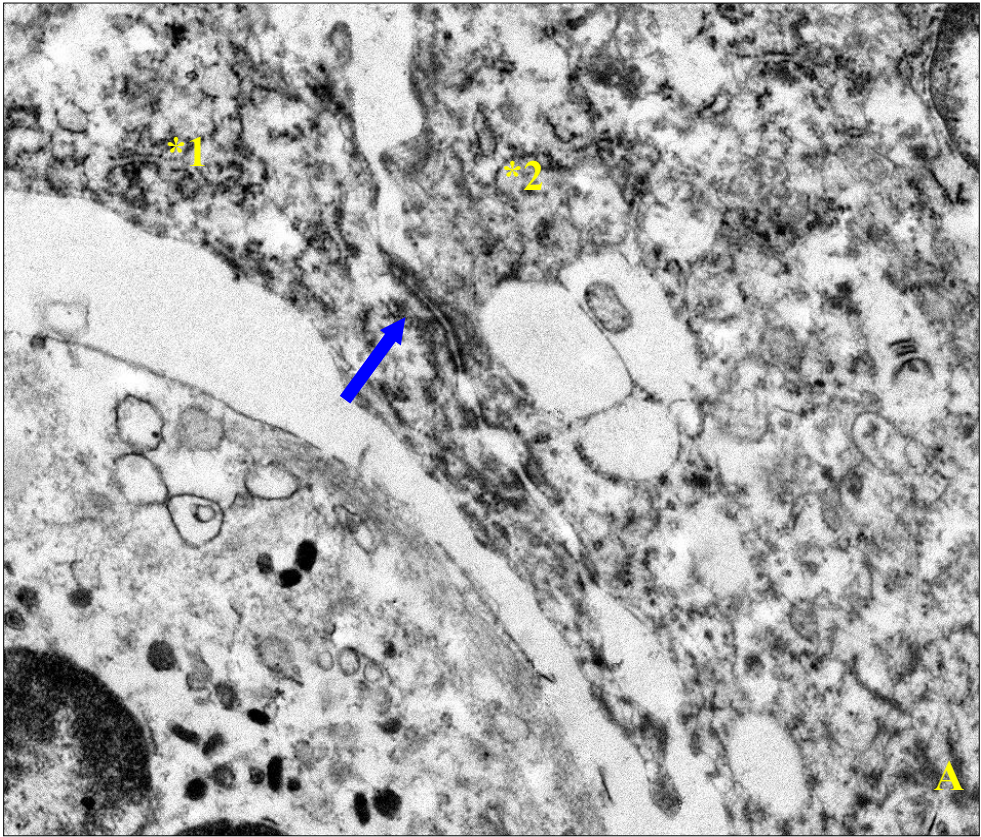


Figura 31. CI mamario canino. Imagen ultraestructural de un canal de mimetismo vascular formado por 3 ELCs (*nº) unidas por desmosomas (ver Figura 32). En el interior del canal de observa un neutrófilo (flecha) (x4000).



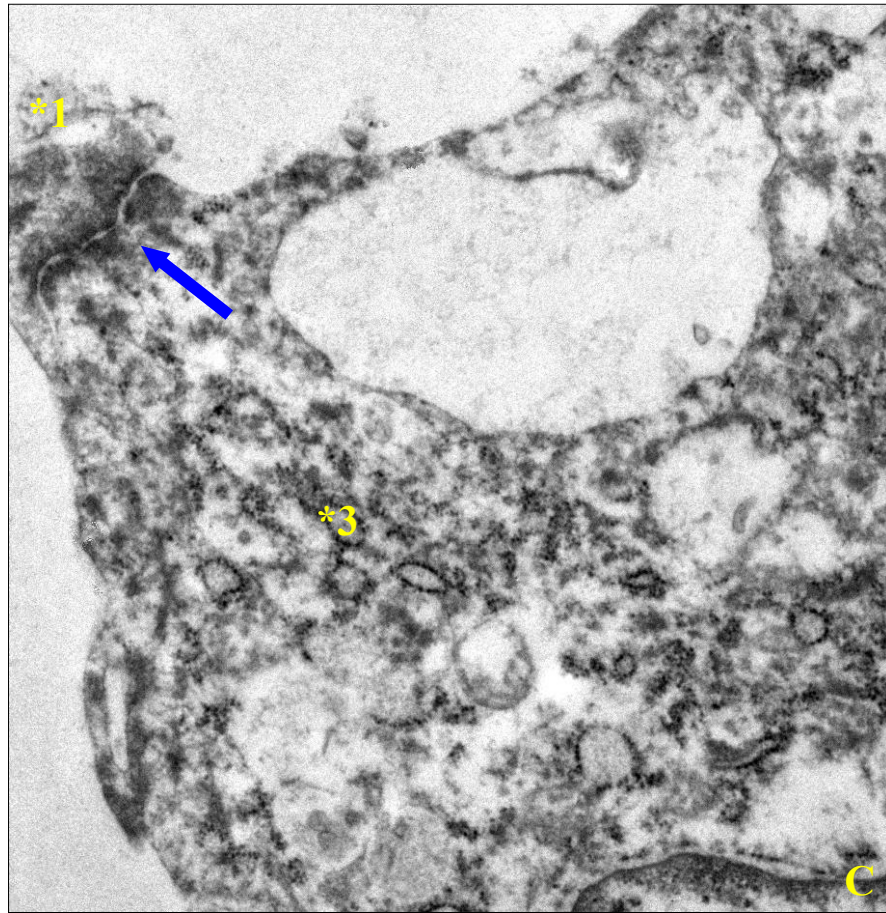


Figura 32. CI mamario canino. Imagen ultraestructural de un canal de mimetismo vascular formado por 3 ELCs (*1, *2 y *3). Detalle de las uniones celulares mediante desmosomas (flechas azules en **A**), **B**) y **C**)). **A**) Unión entre las células *1 y *2 (x15000). **B**) Unión ente las células *2 y *3 (x12000). **C**) Unión entre las células *1 y *3 (x25000). Abundante retículo endoplásmico rugoso.

1.12. Análisis estadístico

Se ha llevado a cabo un análisis para encontrar asociaciones estadísticas entre los resultados de los receptores de hormonas esteroides ($RE\alpha$, $RE\beta$, RP, RA), marcadores relacionados con la angiogénesis (VEGF-A, VEGF-D, VEGFR-3 y COX-2) y de proliferación tumoral o vascular (DMV y LV Ki-67 índice).

1.12.1. Asociaciones entre receptores hormonales, marcadores de angiogénesis, proliferación tumoral y vascular.

Las asociaciones significativas (y el valor de p) encontradas entre la presencia o ausencia (+/-) y la intensidad de expresión (i) de los receptores de hormonas esteroides ($RE\alpha$, $RE\beta$, RP, RA) y los marcadores relacionados con la angiogénesis (VEGF-A, VEGF-D, VEGFR-3, COX-2), con la proliferación tumoral (% Ki-67), con la densidad vascular (DMV) y con la proliferación vascular linfática (LV Ki-67 índice), en todos los tumores y por grupos tumorales (CI y TMM no-CI), se encuentran resumidos en la **Tabla 20**.

Tabla 20. Asociaciones significativas entre receptores de hormonas esteroides y parámetros de angiogénesis y proliferación tumoral y vascular.

| | $RE\beta(+/-)$ | $RE\beta(i)$ | $RP(+/-)$ | $RP(i)$ | $RA(+/-)$ | $RA(i)$ |
|--------------------------|----------------|------------------|-------------------|----------------------------------|-------------|--|
| VEGFA (i) | | | | | | $p=0,017^*$ |
| VEGFD (+/-) | $p=0,032^*$ | | | | $p=0,032^*$ | |
| VEGFD (i) | | | | $p=0,06^*$ $p=0,000^\dagger$ | | $p=0,001^*$ $p=0,004^\dagger$ $p=0,044^\ddagger$ |
| VEGFR-3 (+/-) | | | $p=0,037^\dagger$ | | | |
| VEGFR-3 (i) | | $p=0,05^\dagger$ | | $p=0,009^\dagger$ | | $p=0,019^*$ |
| COX2 (i) | | $p=0,019^*$ | | $p=0,000^*$ $p=0,000^\dagger$ | | $p=0,000^*$ $p=0,000^\dagger$ |
| DMV | | $p=0,05^\dagger$ | | | | |

* asociación significativa teniendo en cuenta todos los tumores (CI y TMM no-CI).

† asociación significativa en los CI.

‡ asociación significativa en los TMM no-CI.

1.12.2. Asociaciones entre parámetros relacionados con la angiogénesis y de proliferación tumoral y vascular

Las asociaciones existentes entre la intensidad de inmunoexpresión de los diferentes factores relacionados con la angiogénesis para todos los tumores se encuentran resumidos en la **Tabla 21**.

Tabla 21. Asociaciones significativas entre parámetros relacionados con la angiogénesis, proliferación tumoral y vascular (variables de intensidad) en todos los tumores (CI y TMM no-CI).

| | VEGF-D | VEGFR-3 | COX-2 | DMV | LV Ki-67 Índex |
|---------|-----------|-----------|-----------|-----------|-------------------|
| VEGF-A | $p=0,000$ | $p=0,06$ | | $p=0,05$ | |
| VEGF-D | | $p=0,003$ | $p=0,002$ | $p=0,019$ | $p=0,027$ |
| VEGFR-3 | | | $p=0,009$ | | $p=0,058$ |
| COX-2 | | | | $p=0,036$ | $p=0,002$ |
| DMV | | | | | $p=0,045$ |

Las asociaciones existentes entre la intensidad de inmunoexpresión de los diferentes factores relacionados con la angiogénesis para cada uno de los grupos tumorales (CI y TMM no-CI respectivamente) se encuentran resumidos en la **Tabla 22**.

Dentro de los tumores CI se encontró una asociación estadística significativa entre la intensidad de inmunoexpresión de los factores VEGF-A y % Ki-67, VEGF-D y su receptor VEGFR-3 ($p=0,001$), entre VEGF-D y COX-2 ($p=0,001$) y entre VEGFR-3 y COX-2 ($p=0,017$). En los tumores TMM no-CI, existieron asociaciones significativas entre VEGF-A y COX-2 ($p=0,031$), COX-2 y LV Ki-67 índex ($p=0,013$) y entre LV Ki-67 índex y VEGFR-3 ($p=0,005$).

Tabla 22. Asociaciones estadísticas significativas entre factores de angiogénesis.

| | VEGFR-3 | COX-2 | % Ki-67 |
|------------------|--------------------|--------------------|------------------|
| VEGF-A | | $p=0,031 \ddagger$ | $p=0,06 \dagger$ |
| VEGF-D | $p=0,001 \dagger$ | $p=0,001 \dagger$ | |
| VEGFR-3 | | $p=0,017 \dagger$ | |
| LVKi-67 Índex | $p=0,005 \ddagger$ | $p=0,013 \ddagger$ | |

\dagger asociación significativa en los CI.

\ddagger asociación significativa en los TMM no-CI.

1.12.3. Análisis multivariante

Teniendo en cuenta todos los tumores de forma conjunta y considerando DMV como variable dependiente, la variable que se asoció de forma independiente fue VEGFR-3 ($p=0,025$). Seleccionando LV Ki-67 índice como variable dependiente, la variable que se asoció en primer lugar de forma independiente fue COX-2 ($p=0,008$) y en segundo lugar VEGF-A ($p=0,057$). En el grupo TMM no-CI, para la variable dependiente LV Ki-67 índice, se asoció en primer lugar como variable independiente VEGFR-3 ($p=0,01$) y en segundo lugar COX-2 ($p=0,022$).

2. ESTUDIO DE PATRÓN DE METÁSTASIS A DISTANCIA EN CI MAMARIO CANINO RESPECTO A TMM NO-CI.

Se incluyeron 72 animales necropsiados en el Servicio de Anatomía Patológica del HCV de la Facultad de Veterinaria de la UCM, que habían sido diagnosticados de tumores mamarios malignos GHM III (CI y TMM no-CI) en la consulta de Oncología Mamaria (HCV, UCM) y que presentaban metástasis a distancia de dicho tumor mamario. Éstos fueron divididos en dos grupos en función de que el tumor mamario fuera CI o TMM no-CI.

2.1. Hallazgos de necropsia. Metástasis a distancia

En el estudio macroscópico de necropsia se observaron algunas características típicas de los CI mamarios caninos, que no fueron observadas en los casos de TMM no-CI. Dentro de éstas, los hallazgos diferenciales más destacables son la presencia de lesiones en la piel, eritema, y/o úlceras en la zona de la glándula mamaria, con o sin la presencia de nódulo mamario y metástasis a nódulos linfáticos regionales (inguinal y axilar) (**Figura 33**). Por otro lado, también se apreció un severo y difuso edema subcutáneo y muscular de las extremidades afectadas (frecuentemente se ven afectadas las extremidades posteriores) (**Figura 34**) y una severa infiltración regional neoplásica del tejido adiposo y muscular (**Figura 35**).



Figura 33. Tumores mamarios caninos. Estudio macroscópico de necropsia. **A)** CI mamario canino. Presencia de lesiones (eritema y úlceras) en la piel de la zona mamaria y de las extremidades posteriores. **B)** TMM no-CI. Presencia de nódulos mamarios de gran tamaño sin afectación de la piel de la región mamaria ni de las extremidades.



Figura 34. CI mamario canino. Hallazgos macroscópicos de necropsia. **A)** Edema subcutáneo. **B)** Edema muscular. **C)** Edema de la extremidad posterior.

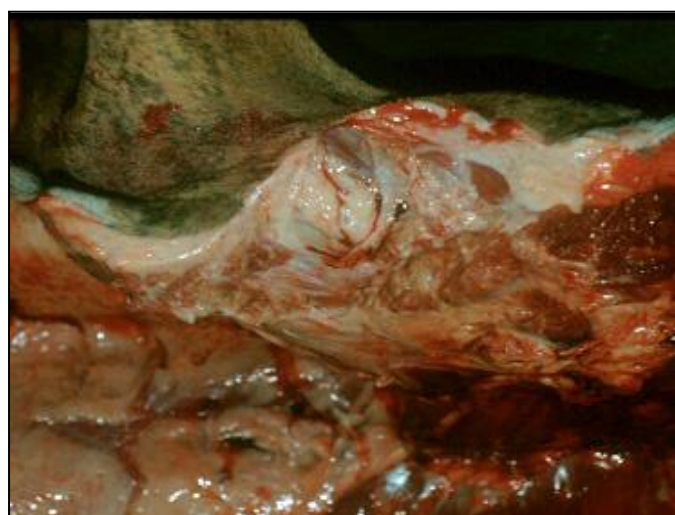


Figura 35. CI mamario canino. Hallazgos macroscópicos de necropsia. Infiltración tumoral del tejido muscular

Los resultados obtenidos, en cuanto a porcentaje de afectación de órganos por metástasis del tumor mamario, en función del grupo al que pertenecían (CI o TMM no-CI), se encuentran especificados en la **Tabla 23**.

Tabla 23. Metástasis a distancia en necropsia en los grupos CI y TMM no-CI.

| ÓRGANOS | CI (n=39) | | TMM no-CI (n=33) | |
|--|-----------|-------|------------------|-------|
| | n | % | n | % |
| Ganglios regionales | 37 | 94,9% | 33 | 100% |
| Pulmón ($p=0,031$) | 29 | 74,4% | 31 | 93,9% |
| Corazón | 2 | 5,1% | 2 | 6,1% |
| Bazo | 1 | 2,6% | 4 | 12,1% |
| Hígado ($p=0,009$) | 1 | 2,6% | 8 | 24,2% |
| Riñón ($p=0,02$) | 1 | 2,6% | 7 | 21,2% |
| Páncreas | 0 | 0% | 1 | 3% |
| Glándula Adrenal | 1 | 2,6% | 2 | 6,1% |
| Vejiga Orina ($p=0,013$) | 7 | 17,9% | 0 | 0% |
| Reproductor ($p=0,120$) | 4 | 10,5% | 0 | 0% |
| Cerebro | 0 | 0% | 3 | 9,10% |
| Hueso ($p=0,04$) | 0 | 0% | 4 | 12,1% |
| Músculo | 0 | 0% | 3 | 9,1% |

Tanto en las metástasis en la vejiga de la orina como en el aparato reproductor, éstas no se produjeron por infiltración directa del tumor hacia planos profundos, sino que durante la observación histológica de las muestras se pudieron apreciar émbolos tumorales en el interior de los vasos de éstos tejidos mientras que las serosas estaban libres de infiltración tumoral (**Figura 36 y 37**).

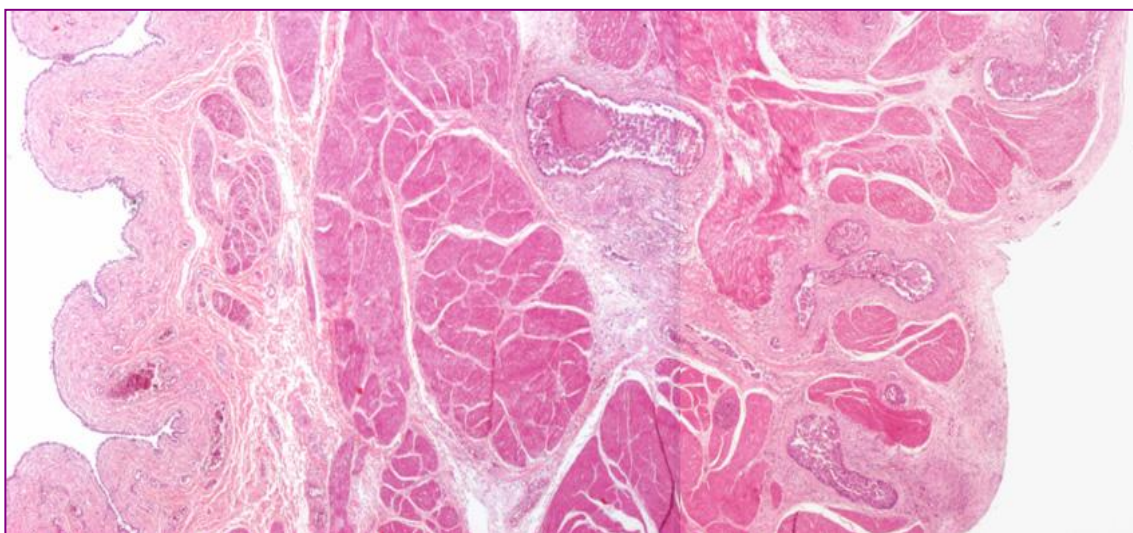


Figura 36. CI mamario canino. Metástasis en vejiga de la orina, H-E. Numerosos émbolos tumorales (x2).

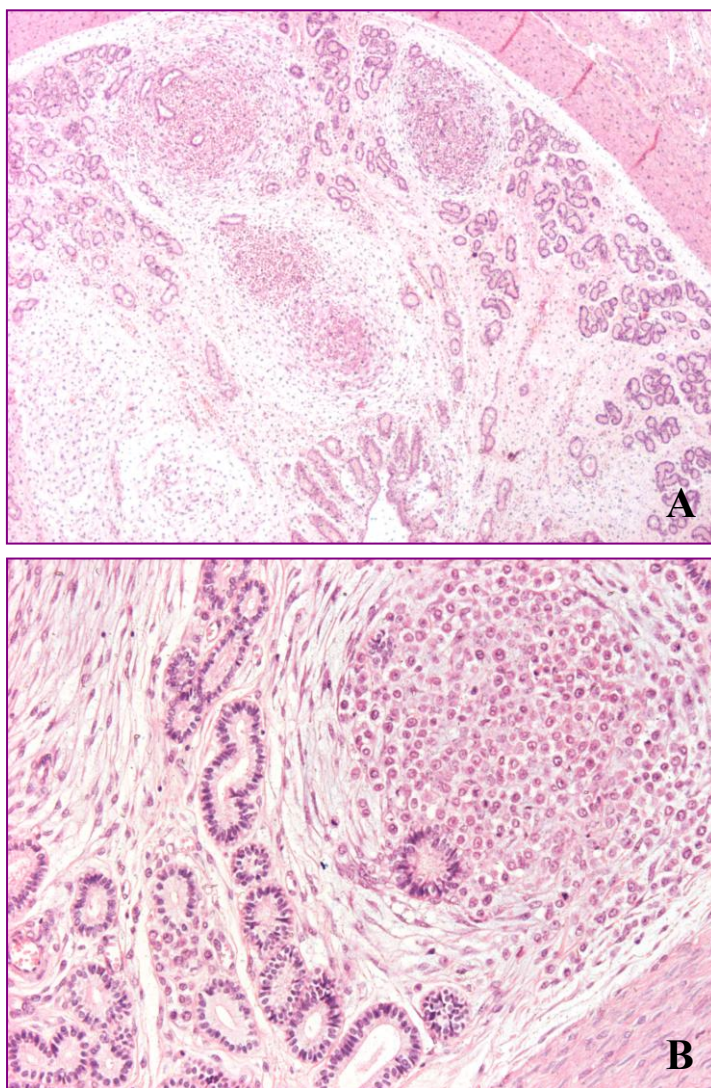
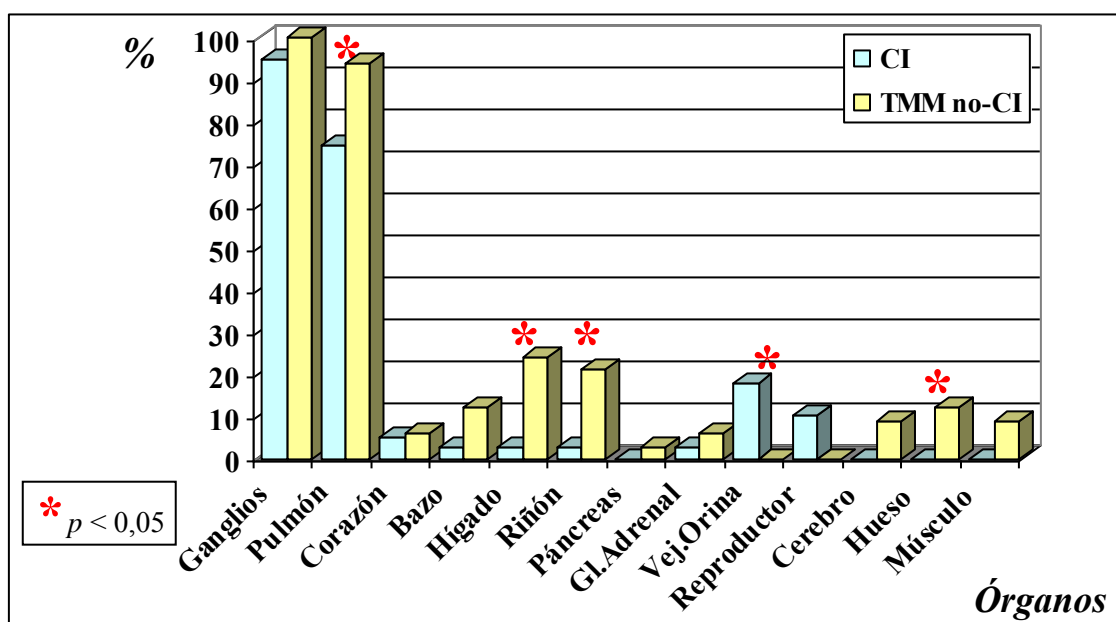


Figura 37. CI mamario canino. Metástasis en útero, H-E. Infiltración tumoral. **A)** (x2). **B)** (x20).

El análisis estadístico mostró que existen diferencias significativas ($p < 0,05$) en los órganos internos afectados por metástasis en necropsia entre las perras que mueren por CI mamario (grupo CI) o por TMM metastásico no CI (grupo no CI) **Tabla 23**. En los CI mamario, los pulmones ($p=0,031$) (**Figura 38**), el hígado ($p= 0,009$) (**Figura 39 A**), los riñones ($p=0,02$) (**Figura 39 B**) y el hueso ($p= 0,04$) (**Figura 39 C**), se encuentran significativamente menos afectados por metástasis a distancia del tumor mamario, que los casos de TMM no-CI. Sin embargo, en los CI se encuentra significativamente más afectada la vejiga de la orina ($p=0,013$) (**Figura 40**) y el aparato reproductor (10,2%, $p=0,120$), que en los TMM no-CI, puesto que no se apreciaron metástasis a estos órganos en ningún caso de TMM no-CI. La distribución de metástasis por órganos y tipo tumoral se representa en la **Gráfica 1**.

Grafica 1. Distribución de metástasis en tejidos caninos de perras afectadas por tumores mamarios metastásicos (CI o TMM no-CI).



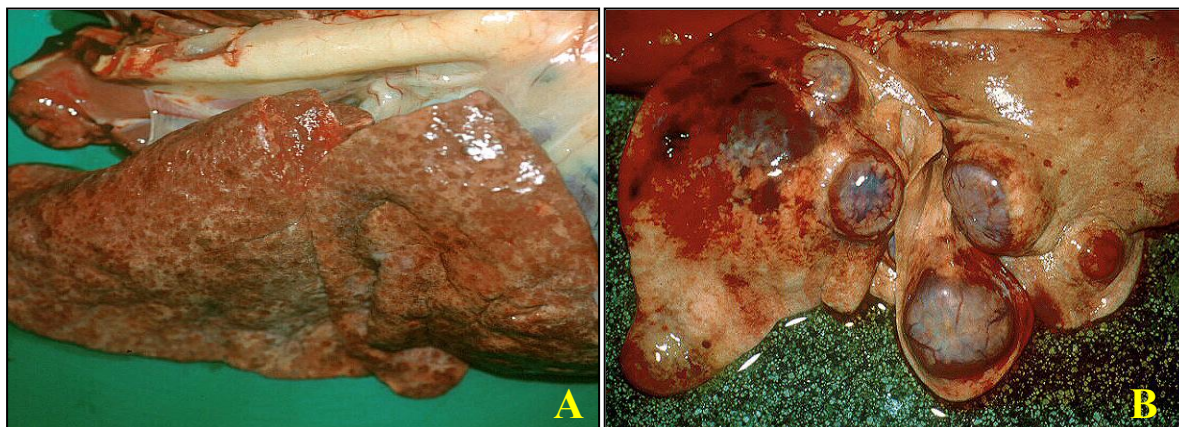


Figura 38. A) CI mamario canino. Ausencia de metástasis en pulmón. B) TMM no-CI. Pulmón con metástasis del tumor mamario.

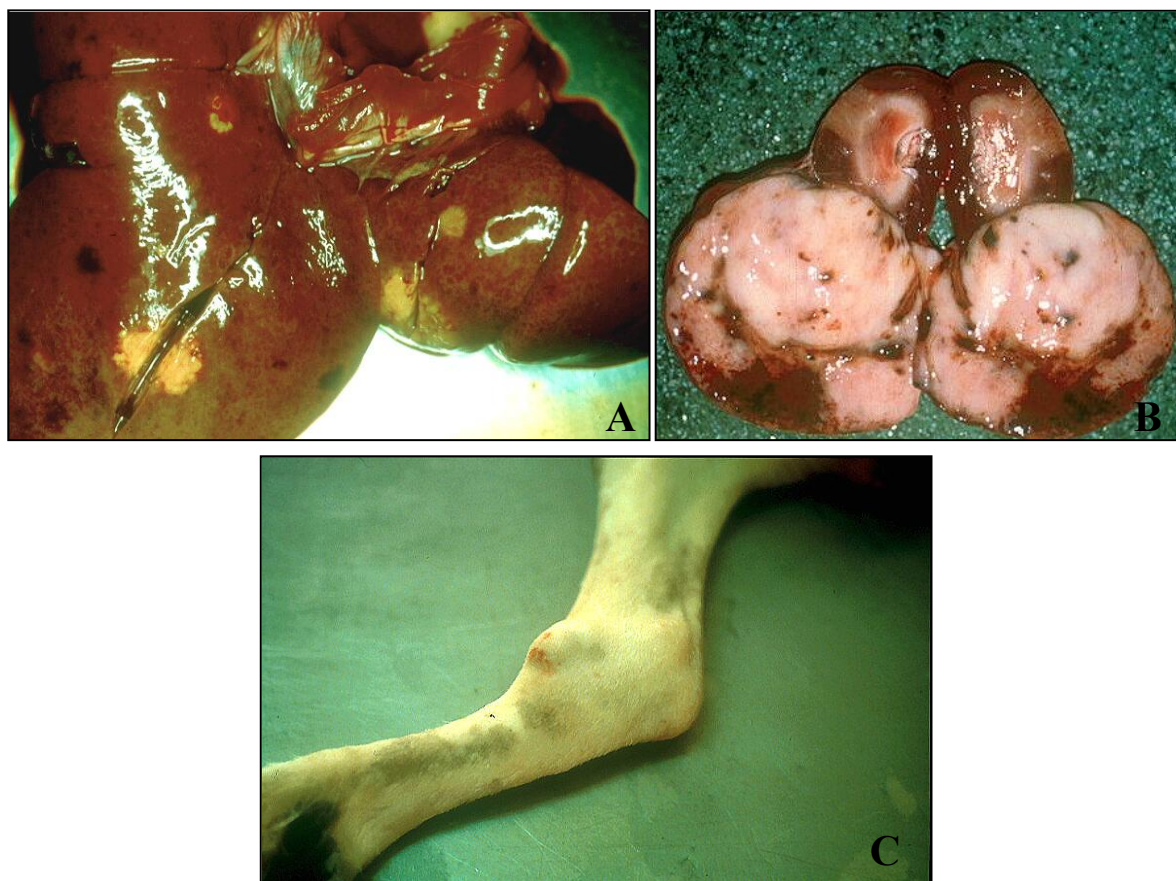


Figura 39. Metástasis más frecuentes en TMM no-CI que en CI. A) Hígado con metástasis de TMM no-CI. B) Riñón con metástasis de TMM no-CI. C) Extremidad posterior con metástasis en hueso de TMM no-CI.

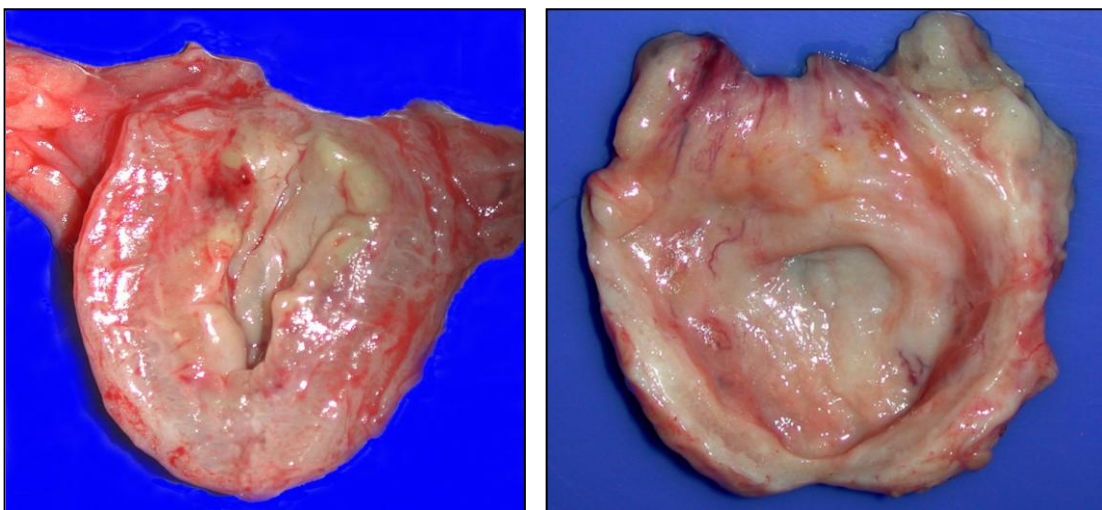


Figura 40. CI mamario canino. Vejiga de la orina con metástasis del tumor mamario.

V DISCUSIÓN

V. DISCUSIÓN

Este trabajo de Tesis Doctoral presenta un estudio histológico e inmunohistoquímico diferencial realizado en tumores mamarios caninos malignos, metastásicos, de alto grado de malignidad, incluyendo el cáncer inflamatorio. Se han realizado dos estudios relacionados entre sí: estudio de inmunofenotipo y angiogénesis y estudio de patrón de metástasis.

En el estudio de inmunofenotipo y angiogénesis se han incluido 42 muestras de tumores mamarios caninos, procedentes de 22 casos de carcinoma inflamatorio (CI) mamario y de 20 tumores mamarios malignos metastásicos de grado histológico de malignidad (GHM) III (TMM no-CI). Además, se incluyeron muestras de tejido mamario sin alteraciones, que sirvieron como control. Se han estudiado los diferentes tipos celulares que participan en los CI y en los TMM no-CI y se han descrito los diferentes tipos histológicos que participan en dichos tumores. Además, se ha comparado la expresión inmunohistoquímica de receptores hormonales y de marcadores de angiogénesis (vasos sanguíneos y linfáticos) entre los CI y los TMM no-CI caninos.

Por otro lado, se ha comparado el patrón de metástasis tumoral en el CI y en los TMM no-CI en 72 necropsias de perras que murieron debido a cáncer mamario metastático (CI y TMM no-CI).

Debido a la escasa información en medicina veterinaria sobre el carcinoma inflamatorio mamario canino, en algunos aspectos hemos tenido que recurrir como referencia al carcinoma mamario humano.

Como se ha descrito previamente, la **edad** es un factor asociado a una elevada malignidad y a un peor pronóstico en los tumores mamarios caninos (Fowler *et al.*, 1974; Pérez-Alenza *et al.*, 2000). La edad de las perras afectadas por CI y por TMM no-CI fue similar, la media de ambos grupos fue cercana a los 11 años (CI 11 años; TMM no-CI 11,5 años) ($p= 0,84$). La edad media de las perras incluidas en el grupo CI se asemeja a la descrita previamente en perras afectadas de CI (11,4 años) (Pérez-Alenza *et al.*, 2001); por otro lado, la edad media de las perras del grupo TMM no-CI fue ligeramente mayor a la que se había descrito por nuestro grupo de investigación para tumores mamarios malignos

9,7 años (Pérez-Alenza *et al.*, 1997), 9,9 años (Pérez-Alenza *et al.*, 2001), aunque coincide con la observada por otros autores (11 años) (Fowler *et al.*, 1974). La diferencia de edad observada en el estudio de Pérez-Alenza *et al.*, (2001) entre los casos con CI y TMM no-CI probablemente se debe a que se incluyeron tumores malignos de diferente malignidad histológica, mientras que en nuestro estudio sólo se incluyeron tumores de elevada malignidad histológica (GHM III)

La distribución de los tumores mamarios por **raza** fue bastante amplia. Las razas representadas en los grupos CI y TMM no-CI fueron similares, siendo en ambos casos la raza Pastor Alemán y los mestizos (generalmente mayores de 20 Kg) las más afectadas por estos tipos tumorales, seguidas de otras razas puras. Al igual que en previos estudios de CI (Susaneck *et al.*, 1983; Pérez-Alenza *et al.*, 2001) y en el estudio epidemiológico de TMM no-CI más reciente (Pérez-Alenza *et al.*, 1998), no encontramos predisposición racial a padecer CI ni a padecer TMM no-CI en el área de Madrid.

Los resultados obtenidos con respecto al **peso** de las perras afectadas fueron, nuevamente, similares para los casos CI (media 23,4 Kg) y los TMM no-CI (media 22,7 Kg) ($p= 0,89$). Estos resultados son semejantes a los obtenidos previamente para los CI (>20 Kg) (Susaneck *et al.*, 1983) y TMM no-CI (media 18,4 Kg) (Pérez-Alenza *et al.*, 1997).

En resumen, los animales de ambos grupos fueron prácticamente iguales en cuanto a **edad**, **raza** y **peso**, lo que favorece la validez del estudio al ser comparados ambos grupos. Los resultados indican que tanto los CI como los tumores mamarios altamente malignos, son más frecuentes en perras de edad avanzada (mayores de 11 años) y de razas grandes (mayores de 20 Kg).

Con respecto al **estado reproductivo** de las perras incluidas en nuestro estudio, el 82% de las del grupo CI y el 95% de las del grupo TMM no-CI estaban enteras en el momento del desarrollo del tumor mamario. Las hormonas esteroides sexuales juegan un papel fundamental en la patogénesis de los tumores mamarios caninos (Rutteman, 1990).

Dentro del grupo de perras con CI, se observaron los dos **tipos de CI** que se han descrito previamente en la perra (Pérez-Alenza *et al.*, 2001) y en la mujer (Taylor y Meltzer, 1938). En este estudio encontramos un mayor número de CI primarios (52,6%) que secundarios (47,4%), resultado ligeramente diferente a lo observado por Pérez-Alenza

et al., (2001), que encontraron una proporción de CI primarios del 42% y de secundarios de 58%. No hemos observado una mayor predisposición a padecer CI primarios o secundarios en función de la edad ($p=0,263$), raza ($p=0,365$), ni peso ($p=0,717$).

Hasta la fecha, el **índice de proliferación Ki-67** (% Ki-67) se ha considerado como un buen factor pronóstico en los tumores mamarios caninos malignos (Peña *et al.*, 1998; Nieto *et al.*, 2000; Zuccari *et al.*, 2004; De Matos *et al.*, 2006) y también en el cáncer mamario de la mujer (*ver artículo de revisión de* Stuart-Harris *et al.*, 2008; Viale *et al.*, 2008). Hay que destacar el elevado índice de Ki-67 en todos los tumores incluidos, ya que entre el 30 y el 37% de las células presentes se encuentran proliferando. Éste porcentaje obtenido es muy superior al encontrado previamente en otro estudio que incluyó tumores mamarios caninos malignos de GHM I, II y III, en el que la media del valor de Ki-67 fue del 7,33% (Peña *et al.*, 1998). En nuestro estudio se ha podido comprobar que la semejanza existente entre ambos grupos (CI y TMM no-CI) también se reflejó en su índice de proliferación tumoral. No existieron diferencias significativas en el valor medio del índice de Ki-67 en los CI (media 37,6%) con respecto los TMM no-CI (media 30,2%) ($p=0,081$). El hecho de que el valor medio del índice de proliferación celular Ki-67 sea prácticamente igual entre los CI y TMM no-CI y teniendo en cuenta que todos los casos eran de GHM III, nos indica que realmente los casos seleccionados en ambos grupos fueron muy similares en cuanto a su capacidad de proliferación y crecimiento y confiere rigor científico al estudio de comparación que se realiza en esta Tesis Doctoral.

En el **estudio histopatológico** de los 42 tumores (22 CI y 20 TMM no-CI) éstos se diagnosticaron en función de la clasificación de la OMS para neoplasias caninas y felinas (Misdorp *et al.*, 1999). En los TMM no-CI, las características histológicas coincidieron con las descritas en la clasificación de la OMS para neoplasias caninas y felinas (Misdorp *et al.*, 1999). En los CI, las características y patrones histológicos coincidieron en gran medida con lo descrito previamente por nuestro equipo (Peña *et al.*, 2003a); sin embargo, en el presente trabajo de investigación se han detectado algunos resultados novedosos con respecto a la histopatología del carcinoma inflamatorio mamario canino.

En el estudio previo en el que se describió por primera vez la existencia de **carcinomas ricos en lípidos** en los CI (Peña *et al.*, 2003a), se encontró que este tipo histológico estaba presente en un 15% de los tumores; sin embargo, la frecuencia de carcinomas lipídicos encontrados en nuestro estudio dentro del grupo CI fue superior a la

observada previamente, siendo del 22,7%. Por el contrario, no se diagnosticó ningún carcinoma rico en lípidos en el grupo de TMM no-CI. Los carcinomas ricos en lípidos son considerados un tipo de carcinoma mamario raro en la mujer (Tavassoli, 1999) y en la perra (Misdorp *et al.*, 1999) y se han relacionado con un pronóstico desfavorable tanto en la mujer (Shi *et al.*, 2008), como en la perra (Espinosa de los Monteros *et al.*, 2003), en la que se ha encontrado que existe asociación entre este tipo tumoral y la aparición de recidivas locales y/o metástasis a distancia. El significado de la elevada proporción de carcinomas ricos en lípidos en los CI es aún desconocido, pero en la mujer se ha relacionado con influencias de las hormonas esteroides sexuales (Tsubura *et al.*, 1991). En nuestro estudio hemos observado que los carcinomas ricos en lípidos eran positivos en gran medida a los receptores de hormonas esteroides estudiados, puesto que presentaron una inmunotinción de intensidad moderada o fuerte a los marcadores de RE β , RP, RA. Por otro lado, también podrían verse influenciados por los factores vasculares de crecimiento endotelial (VEGF-A, VEGF-D, VEGFR-3) y por COX-2, puesto que en general, observamos una intensa inmunoeexpresión de estos marcadores en el citoplasma de las células tumorales lipídicas. Así pues, este hecho podría estar relacionado con la elevada capacidad angiogénica y metastásica de estos tipos tumorales, como se ha descrito en la mujer (Shi *et al.*, 2008).

En el cáncer mamario humano se ha descrito la presencia de **estructuras tipo comedo** con una frecuencia del 52%, incluyendo CI y TMM no-CI (Shirakawa *et al.*, 2002d), siendo significativamente mayor la presencia de estas formaciones en los tumores que presentan mimetismo vascular (en el 84,6%) que en los que no lo tienen (Shirakawa *et al.*, 2002d). En la especie canina, se describió que la frecuencia de estructuras tipo comedo en los CI era de un 35% (Peña *et al.*, 2003a). Los resultados obtenidos en nuestro estudio, con diferentes casos analizados, son similares a los obtenidos en el estudio de Peña *et al.* (2003a), puesto que se ha descrito la presencia de estructuras tipo comedo en el 36,4% de los casos de CI, a diferencia de los casos de TMM no-CI, en los que no se observaron estas estructuras. La frecuente aparición de estructuras tipo comedo en los CI mamarios caninos, con la típica presencia de necrosis central, no parece ser debido a una mayor proliferación en estos tumores (tal y como indica la proliferación tumoral medida con Ki-67), pero podría deberse a la presencia de factores desconocidos inductores de necrosis y/o apoptosis. De acuerdo con nuestros resultados, no parece que los receptores de las hormonas esteroides (RE α , RE β , RP y RA) se encuentren relacionados con la formación de

estas estructuras. Así mismo, la presencia de estructuras tipo comedo tampoco se encontró relacionada con los factores de crecimiento VEGF-A y VEGF-D, ni los valores del índice Ki-67 o LV Ki-67. Sí existe una asociación inversa entre la inmunoexpresión de VEGFR-3 ($p=0,035$), COX-2 ($p=0,05$) y el índice de densidad microvascular (DMV) ($p=0,039$) con estas formaciones. Puesto que los factores VEGFR-3 y COX-2 intervienen en el proceso de angio- y linfangiogénesis y la DMV nos indica la cantidad de microvasos que hay en el tumor, la aparición de estructuras tipo comedo parece estar relacionada con los fenómenos de angiogénesis en el CI.

En los casos de CI incluidos en este trabajo, no fue tan frecuente la coincidencia entre la presencia de estructuras tipo comedo y mimetismo vascular, como la encontrada en los CI humanos (Shirakawa *et al.*, 2002d), ya que en nuestro estudio coincidieron en el 12,5% de los casos. De acuerdo con nuestros resultados, la aparición de estructuras tipo comedo se asocia con una menor densidad vascular. El mimetismo vascular (MV) podría ser un mecanismo alternativo de angiogénesis para que el tumor pueda conseguir el aporte de nutrientes que se ve disminuido. De hecho, en el estudio realizado en el CI de la mujer (Shirakawa *et al.*, 2002d), observaron que las zonas de necrosis centrales de las estructuras tipo comedo desaparecían y eran sustituidas por canales de MV. Debido a que el número de muestras utilizadas en el estudio de los tumores mamarios de mujer (331 muestras) (Shirakawa *et al.*, 2002d) fue muy superior a la del nuestro, es posible que ampliando nuestro número de casos se encontrara una mayor relación entre la existencia de estructuras tipo comedo y el MV.

Teniendo en cuenta esta elevada frecuencia de aparición de formaciones de tipo comedo, pensamos que, de la misma manera que ocurre para la clasificación de tumores mamarios en la mujer, el tipo histológico *Comedocarcinoma* debería ser incluido en una futura nueva clasificación histológica de neoplasias mamarias caninas y felinas.

Por otro lado, a pesar de que el carcinoma inflamatorio no se corresponde con un tipo histológico específico de cáncer mamario en la mujer (Taylor y Meltzer, 1938; Pérez-Mesa, 1967; Haagensen, 1971; Saltzstein, 1974; Droulias *et al.*, 1976) ni en la perra (Pérez-Alenza *et al.*, 2001; Peña *et al.*, 2003a), hasta el momento éste siempre había sido histológicamente diagnosticado como algún tipo de carcinoma altamente maligno, relacionando este tipo tumoral con un origen epitelial. Sin embargo, los resultados obtenidos en el presente estudio muestran que no todos los cánceres inflamatorios

mamarios son carcinomas, sino que es posible un origen mesenquimatoso de este tipo tumoral. Por primera vez hemos descrito la presencia de un cáncer inflamatorio diagnosticado como **sarcoma**. El diagnóstico de sarcoma fue confirmado mediante el marcaje inmunohistoquímico: el tumor fue negativo a citoqueratinas (pancitoqueratina y 14), positivo a vimentina, α -actina de músculo liso y desmina, positivo a vWF, negativo a CD31 y CD34 y positivo a S-100. Así pues, se confirmó que su origen celular no era epitelial, sino mesenquimatoso.

Desde que se realizó la primera descripción del cáncer inflamatorio mamario en la mujer (Bell, 1814), esta enfermedad ha recibido diferentes nombres, pero en la mayoría de los casos se ha conocido con algún nombre que recordara que el diagnóstico histológico de estos tumores era algún tipo de carcinoma. En el caso concreto de la perra, desde la primera descripción de la enfermedad se conoció como carcinoma inflamatorio mamario (Susaneck *et al.*, 1983), al igual que sucedió en la gata (Perez-Alenza *et al.*, 2004). Así pues, en general este tipo tumoral se ha conocido en la mujer, en la perra y en la gata como carcinoma inflamatorio. Teniendo en cuenta el posible desarrollo de tumores inflamatorios de origen mesenquimatoso, proponemos que el término de Carcinoma Inflamatorio sea sustituido por el término más amplio de **Cáncer Mamario Inflamatorio** para nombrar a esta enfermedad.

El diagnóstico y pronóstico de las neoplasias mamarias caninas basados en la histopatología rutinaria son imprecisos, como se observa por las numerosas clasificaciones histológicas descritas en la literatura (Moulton *et al.*, 1970; Misdorp *et al.*, 1971, 1972, 1973; Fowler *et al.*, 1974; Hampe y Misdorp, 1974; Monlux *et al.*, 1977; Misdorp *et al.*, 1999). Existen diferentes tipos de tumores malignos basados en las características histológicas, pero de los que no siempre es posible determinar el origen; por eso se han realizado estudios en los que se ha evaluado la expresión inmunohistquímica de filamentos intermedios en los tumores mamarios caninos (Cardona *et al.*, 1989; Hellmen y Lindgren, 1989; Moore *et al.*, 1989; Destexhe *et al.*, 1993; Griffey *et al.*, 1993; Vos *et al.*, 1993a, b; Espinosa de los Monteros *et al.*, 2002; Espinosa de los Monteros *et al.*, 2005). Sin embargo, hasta el momento no se habían realizado estudios de **inmunofenotipo** empleando marcadores de origen tumoral (celular) para valorar la participación de los distintos tipos celulares en el CI mamario canino, ni se han comparado éstos con los presentes en los TNM no-CI. Como comentamos en el apartado de resultados y al inicio de la discusión, gracias a este estudio de marcadores tumorales pudimos confirmar el diagnóstico realizado

por H-E de algunos de nuestros tumores y en otros casos re-diagnosticarlos, como sucedió con el caso de sarcoma dentro del grupo CI.

Las **citoqueratinas** son filamentos intermedios que sirven para distinguir los tumores epiteliales de los no epiteliales; la **vimentina** es otro filamento intermedio que se expresa en las células mesenquimatosas (Folpe y Gown, 2001). Sin embargo, se ha detectado la presencia de co-expresión de ambos marcadores en las células neoplásicas de cánceres mamarios malignos no CI humanos (Herman *et al.*, 1983; Ramaekers *et al.*, 1983) y caninos (Vos *et al.*, 1993b; Rabanal y Else, 1994). En diferentes estudios experimentales (Hendrix *et al.*, 1997) y en muestras tisulares de tumores mamarios malignos no CI de mujer (Chen *et al.*, 2008; Thomas *et al.*, 1999; Wada *et al.*, 1992) se ha sugerido que la co-expresión de los filamentos intermedios citoqueratina y vimentina en las células epiteliales tumorales, confiere al cáncer mamario un fenotipo más agresivo que está relacionado con un peor pronóstico (Wada *et al.*, 1992; Hendrix *et al.*, 1997; Thomas *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 2008). Además, las alteraciones en la expresión de los filamentos intermedios ocurren como una característica clave en la transición de fenotipo benigno a metastásico en muchos tipos tumorales (Thomas *et al.*, 1999) y existen evidencias de que esta co-expresión de citoqueratina y vimentina se relaciona con un fenotipo metastásico (Herman *et al.*, 1983; Ramaekers *et al.*, 1983; Hendrix *et al.*, 1992; Hendrix *et al.*, 1996; Hendrix *et al.*, 1997). La expresión de vimentina podría asociarse con la rápida proliferación (Raymond y Leong, 1989; Domagala *et al.*, 1990a) y con una diferenciación asociada a una pérdida de contacto entre células (Raymond y Leong, 1989). Sin embargo, se ha considerado que la expresión de vimentina *per sé* no puede ser utilizada para predecir el comportamiento de todos los cánceres mamarios caninos (Vos *et al.*, 1993b) o humanos (Domagala *et al.*, 1990b; Seshadri *et al.*, 1996). En nuestro estudio, la valoración de las células tumorales de origen epitelial (sin tener en cuenta las de origen mioepitelial), en 20 CI y 12 TMM no-CI y de la parte epitelial de los tumores mixtos (4 casos de TMM no-CI), reveló que la co-expresión de citoqueratina y vimentina en dichas células fue más frecuente en los CI (71,4%) que en los TMM no-CI (37,5%). Este resultado podría estar en relación con el peor pronóstico que presenta el CI mamario canino (Pérez-Alenza *et al.*, 2001).

El anticuerpo **anti-citoqueratina 14** reconoce la proteína queratina 14 y reacciona con las células mioepiteliales basales de la mama normal, displásica y tumoral en la mujer (Griffey *et al.*, 1993) y en la perra (Vos *et al.*, 1993a, b). Además, se ha utilizado para diferenciar las células mioepiteliales de los miofibroblastos (Griffey *et al.*, 1993; Espinosa de los Monteros *et al.*, 2002). En nuestro estudio, la citoqueratina 14 ha resultado ser un marcador útil para detectar las células mioepiteliales y poder diferenciarlas de los miofibroblastos; sin embargo, no se trata de un marcador específico de células mioepiteliales, puesto que existió inmunoexpresión de citoqueratina 14 en algunas células neoplásicas epiteliales de CI y de TMM no-CI. Por otro lado, como más adelante desarrollaremos con detalle, parece ser que la presencia de miofibroblastos está asociada con una mayor malignidad tumoral en los tumores mamarios (Yazhou *et al.*, 2004; Surowiak *et al.*, 2006; Surowiak *et al.*, 2007) y otros tipos tumorales (Desmouliere *et al.*, 2004) y con un peor pronóstico (Surowiak *et al.*, 2006; Surowiak *et al.*, 2007), por lo que determinar si las células presentes en un tumor son mioepiteliales o miofibroblastos puede ser de utilidad desde el punto de vista de pronóstico.

Por otro lado, se ha descrito que las células mioepiteliales pueden ser detectadas mediante técnicas inmunohistoquímicas por su elevado contenido en **desmina** (Steven y Lowe, 1992) y que las células mioepiteliales del tejido mamario canino contienen desmina (Hellmen y Lindgren, 1989). Sin embargo, nuestros resultados están de acuerdo con otros estudios en tumores mamarios caninos (Destexhe *et al.*, 1993) y humanos (Peterson y Van Deurs, 1989) en los que no detectaron la expresión de desmina en este tipo celular. En nuestro estudio obtuvimos una escasa expresión (12,5%) de desmina en las células mioepiteliales presentes en los tumores. Por otro lado, de acuerdo con otros autores (Folpe y Gown, 2001), los miofibroblastos raramente expresan desmina, ya que sólo se detectó algún miofibroblasto aislado expresando desmina. Posiblemente, la falta de expresión de desmina por parte de las células mioepiteliales y miofibroblastos se deba a que estas células contienen una pequeña cantidad de este filamento intermedio indetectable con técnicas inmunohistoquímicas habituales. Así pues, el marcador anti-desmina no debe ser seleccionado para detectar células mioepiteliales y/o miofibroblastos en tumores mamarios caninos malignos, aunque sí es un excelente marcador de musculatura lisa y estriada, como ya se ha descrito anteriormente en tumores humanos (Folpe y Gown, 2001).

Mediante el marcaje inmunohistoquímico de los **carcinomas ricos en lípidos** se confirmó el origen epitelial de los mismos, de acuerdo con lo descrito en tumores mamarios caninos no CI (Espinosa de los Monteros *et al.*, 2003), puesto que fueron positivos al marcador de citoqueratinas de amplio espectro (pancitoqueratina). También nuestros resultados coincidieron con el estudio previo (Espinosa de los Monteros *et al.*, 2003) respecto a la falta de expresión de actina y desmina por parte de las células epiteliales neoplásicas. Sin embargo, en alguno de nuestros casos de CI diagnosticados como carcinomas ricos en lípidos, las células epiteliales tumorales expresaron citoqueratina 14 (80%) y vimentina (71,4%) y en el estudio que realizaron Espinosa de los Monteros, *et al.*, no encontraron dicha expresión. La expresión de citoqueratina (amplio espectro y 14) y vimentina por parte de las células neoplásicas podría estar relacionada con una mayor malignidad y agresividad tumoral, puesto que, como hemos comentado anteriormente, la co-expresión de citoqueratina y vimentina parece estar asociado con un peor pronóstico en los tumores mamarios (Wada *et al.*, 1992; Hendrix *et al.*, 1997; Thomas *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 2008). Teniendo en cuenta que los carcinomas ricos en lípidos de este estudio eran del tipo cáncer mamario inflamatorio, es posible que en el estudio previo realizado en carcinomas ricos en lípidos mamarios de la especie canina (Espinosa de los Monteros *et al.*, 2003) no detectaran la co-expresión de citoqueratinas (pancitoqueratina y 14) y vimentina, porque se trataba de tumores mamarios malignos no inflamatorios, con un fenotipo menos agresivo que los CI.

Los **miofibroblastos** son células fusiformes con propiedades contráctiles, que secretan colágeno (Gabbiani *et al.*, 1976; Stevens y Lowe, 1992) y que apenas son visibles en tejidos normales; sin embargo, en caso de lesión tisular se produce una activación y proliferación de los mismos (Steven y Lowe, 1992). La presencia de miofibroblastos se ha descrito en el estroma tumoral de tumores mamarios malignos caninos (Destexhe *et al.*, 1993; Vos *et al.*, 1993a, b; Espinosa de los Monteros *et al.*, 2003) y de la mujer (Tremblay, 1979; Chaponnier y Gabbiani, 2004; Surowiak *et al.*, 2007), pero hasta el momento no se había descrito su presencia en el cáncer mamario inflamatorio canino ni humano. En nuestro estudio, hemos comprobado cómo la respuesta miofibroblástica es mucho más frecuente y abundante en los CI mamarios comparados con las neoplasias del grupo TMM no-CI, y como no se observa presencia de miofibroblastos en la mama normal. Nuestro resultado es similar a lo observado en medicina humana (Yazhou *et al.*, 2004; Surowiak *et al.*, 2006; Surowiak *et al.*, 2007), donde comparando la reacción miofibroblástica presente

en carcinomas de diferente malignidad histológica y en tejido mamario normal, observaron que la presencia de miofibroblastos es mucho mayor cuanto mayor es la malignidad tumoral y que la mama normal no contiene miofibroblastos (Yazhou *et al.*, 2004). Puesto que los miofibroblastos no se encuentran presentes en la mama normal y poseen capacidad contráctil, es posible que la presencia de este tipo celular contribuya a la retracción y podría estar en relación con la desmoplasia que aparece en determinados tumores mamarios. Asimismo, podría estar asociado con la retracción que se observa en la piel y en el pezón que se produce en el carcinoma mamario escirro de la mujer (Seemayer *et al.*, 1979; Tremblay, 1979).

A pesar de todo lo anterior, en la actualidad no se ha confirmado cual es la función de los miofibroblastos en los tumores mamarios. En medicina humana se han postulado dos hipótesis muy diferentes. Por un lado, Seemayer *et al.*, (1979) propusieron que los miofibroblastos podrían constituir un mecanismo de defensa por parte del hospedador para intentar frenar el avance tumoral. La elevada densidad y contractilidad de estas células, situadas rodeando las células neoplásicas, podrían retardar el proceso de invasión y limitar la movilidad y la accesibilidad de las células tumorales a los canales vasculares. Por otro lado, se ha propuesto recientemente otra hipótesis que propone que los propios miofibroblastos participarían en la progresión tumoral, permitiendo la angiogénesis y facilitando la invasión y metástasis de las células tumorales (Desmouliere *et al.*, 2004; Surowiak *et al.*, 2006; Surowiak *et al.*, 2007). La acción ejercida por los miofibroblastos favoreciendo la malignidad tumoral se podría resumir en tres mecanismos: 1) síntesis y expresión de componentes específicos de la matriz extracelular, 2) remodelación mecánica del tejido de granulación y transmisión de tensión de las células tumorales a la matriz extracelular y a otras células y 3) producción de citocinas específicas (Desmouliere *et al.*, 2004). Además, esta segunda hipótesis se ve avalada por un estudio en tumores mamarios de mujer en los que se ha visto que la cantidad de miofibroblastos se encuentra asociada a un peor pronóstico, puesto que el aumento de la cantidad de miofibroblastos se asocia a un mayor valor del índice de proliferación celular Ki-67, a un aumento del factor de crecimiento vascular VEGF-A y a un menor tiempo de supervivencia total (Surowiak *et al.*, 2007).

Considerando las hipótesis descritas y los resultados de nuestro estudio, pensamos que la segunda hipótesis, que propone una participación de los miofibroblastos en el proceso tumoral, es la que probablemente sucede en los tumores mamarios caninos malignos. Aunque los miofibroblastos son células que están presentes en el proceso de cicatrización (Steven y Lowe, 1992), en este trabajo hemos visto que se disponen mayoritariamente alrededor de las células tumorales de alta malignidad histológica. De acuerdo con los autores mencionados (Desmouliere *et al.*, 2004; Surowiak *et al.*, 2006; Surowiak *et al.*, 2007), es posible que los miofibroblastos se encuentren rodeando a las células neoplásicas favoreciendo y participando en la invasión y avance tumoral, ya que existe una mayor proporción de miofibroblastos muy evidente en los CI, siendo estos tumores los que han mostrado una mayor cantidad de factores relacionados con la angiogénesis (VEGF-A, VEGF-D, COX-2, DMV, LV Ki-67 índice), en comparación con los TMM no-CI que mostraron una cantidad mucho menor de miofibroblastos. Si estos resultados se confirmaran en un futuro, sería interesante desde el punto de vista clínico-terapéutico diseñar terapias dirigidas a la destrucción o a la inactivación de miofibroblastos, para frenar la invasión tumoral.

Teniendo en cuenta que tanto la mama normal, como la neoplásica se considera un tejido endocrino (Blankenstein *et al.*, 1999) y que en el tejido mamario y en la patogenia de los tumores mamarios caninos actúan hormonas sexuales (Hyder, 2006), realizamos un estudio de receptores de hormonas esteroides sexuales (**RE α** , **RE β** , **RP**, **RA**) en los CI y TMM no-CI.

Los resultados obtenidos para el **RE α** fueron similares a los descritos previamente en los CI mamarios caninos (Peña *et al.*, 2003a), puesto que casi la totalidad de los tumores de nuestro estudio fueron negativos al RE α y, aunque se observó un mayor porcentaje de casos negativos al RE α en el grupo de CI mamario (87%) comparado con los TMM no-CI (70%), no existieron diferencias significativas entre ambos grupos. En la perra, la mama normal expresa RE α (Illera *et al.*, 2006); sin embargo, los tumores mamarios malignos apenas expresan este receptor y la expresión disminuye cuanto mayor es la malignidad tumoral (Nieto *et al.*, 2000). Teniendo en cuenta esta observación, el resultado de la expresión inmunohistoquímica del RE α del presente estudio cumplió lo esperable, puesto que al proceder de tumores altamente malignos (GHM III), debían ser mayoritariamente negativos a dicho receptor.

En cuanto a la relación del RE α con los parámetros de angiogénesis, en el cáncer mamario de la mujer se ha observado que existe una asociación entre VEGF-A y la negatividad tumoral al RE α (Fuckar *et al.*, 2006). En nuestro estudio no encontramos dicha asociación de forma significativa, aunque el grupo CI presentó un menor porcentaje de casos positivos a RE α y una expresión significativamente mayor de VEGF-A que los TMM no-CI.

En un estudio en tumores mamarios caninos (Nieto *et al.*, 2000) se observó que la cantidad de células positivas al RE α era mayor en los casos que no tenían metástasis con respecto a los casos con metástasis. En nuestro estudio, no se pudo realizar esta diferenciación porque todos nuestros casos presentaron metástasis en el momento de evaluar la expresión del RE α .

Los datos publicados respecto a la alta positividad del **RE β** en los CI mamarios caninos (Illera *et al.*, 2006 (93%)), son similares a los observados en nuestro estudio (100% de los casos CI positivos a RE β). Por otro lado, el porcentaje de expresión del RE β en el grupo TMM no-CI de nuestro estudio fue del 85%, siendo también, un resultado semejante al obtenido previamente (Illera *et al.*, 2006 (81%)). De acuerdo con la revisión bibliográfica realizada, no existen estudios acerca de la expresión y función del RE β en el CI mamario de la mujer, pero en el resto de cánceres mamarios los resultados observados son controvertidos, puesto que el RE β se expresa menos o igual en los tumores mamarios que en las lesiones benignas (Conde *et al.*, 2004). Nuestros resultados apoyan la teoría propuesta para la función del RE β en CI canino (Illera *et al.*, 2006). Dicha teoría sugiere que los estrógenos son utilizados a nivel local en el tejido mamario a través de su unión con el RE β y no a través del RE α , conclusión basada en la detección de grandes cantidades de 17 β -estradiol en los tejidos y escasas cantidades en el suero, y a su vez, basada en el hallazgo de que todos los tumores CI analizados fueron negativos al RE α y positivos al RE β . En nuestro trabajo, el porcentaje de expresión del RE β es significativamente mayor en el grupo CI que en el TMM no-CI ($p=0,05$), a pesar de que en ambos grupos el porcentaje de expresión es muy elevado.

Es interesante destacar que la expresión de RE β se asoció con diversos marcadores de angiogénesis. Así, RE β se asoció con VEGF-D y COX-2 considerando todos los tumores y con DMV y con el receptor de linfangiogénesis VEGFR-3 en el CI mamario canino, indicando una posible participación de los estrógenos en la neoformación de vasos

linfáticos en el CI canino. En el cáncer mamario de la mujer hay escasos estudios que relacionen directamente la expresión del RE β con la angiogénesis, en la rata y en la mujer se ha observado un aumento del ARNm del VEGF inducido por estrógenos y que interactúa con el RE α y RE β (Hyder *et al.*, 2000; Mueller *et al.*, 2000; Buteau-Lozano *et al.*, 2002; Stoner *et al.*, 2004).

Los estudios realizados en el CI mamario humano han determinado que del 16 al 34% de los casos son positivos al **RP** (Paradiso *et al.*, 1989; Fleming *et al.*, 1997; Ueno *et al.*, 1997; Brooks *et al.*, 1998; Wilke *et al.*, 1998) y que la asociación de RE y RP negativa se relaciona con un peor pronóstico (Jaiyesimi *et al.*, 1992). Este porcentaje de positividad es bastante inferior al observado en los CI mamarios caninos en el único estudio previo, en el que se determinó la expresión de este receptor y se observó que el 71% de los tumores eran positivos (Peña *et al.*, 2003a); por otro lado, dicho resultado es semejante al obtenido en nuestros casos de CI (73%). Asimismo, la expresión de RP en el grupo TMM no-CI fue elevada (75%) con respecto a lo descrito previamente para tumores mamarios caninos malignos (Raynaud *et al.*, 1981; Parodi *et al.*, 1984; Sartin *et al.*, 1992) y no hubo diferencias significativas con respecto a la expresión de RP en el grupo CI. El porcentaje de expresión del RP en los tumores mamarios caninos malignos se ha descrito entre un 8 (Raynaud *et al.*, 1981; Parodi *et al.*, 1984) y un 22% (Sartin *et al.*, 1992) y se ha admitido que este porcentaje disminuye al aumentar la malignidad tumoral (Donnay *et al.*, 1995; Millanta *et al.*, 2005). Sin embargo, en contraste con los datos previos de tumores mamarios caninos, nuestros datos se asemejan a los obtenidos en un estudio inmunohistoquímico de detección del RP en tumores mamarios caninos (de Las Mulas *et al.*, 2005), en el que se observó que los tumores mamarios malignos expresan el RP con mayor frecuencia que los tumores mamarios benignos. En los estudios realizados en medicina humana se ha descrito que las isoformas del RP son un factor importante en la inducción de VEGF-A en las células de las neoplasias mamarias (Wu *et al.*, 2004), que la progesterona induce VEGF-A en células tumorales mamarias (Hyder *et al.*, 1998; Hyder *et al.*, 2001; Mirkin y Archer, 2004; Liang y Hyder, 2005) y que el VEGF-A inducido por progesterona es angiogénicamente activo, originando proliferación endotelial y tumoral en el cáncer mamario (Liang y Hyder, 2005).

En nuestro estudio, se comprueba la asociación estadística de RP con algunos factores de angiogénesis: considerando todos los tumores de forma conjunta, RP se asoció COX-2, mientras que en el grupo CI se asoció con VEGF-D, VEGFR-3 y COX-2. Como vemos, es muy posible que la elevada expresión de RP existente en los tumores CI, esté en relación con la regulación de la angiogénesis y/o linfangiogénesis tumoral.

Con respecto a la relación del RP y las metástasis a distancia en el CI mamario canino, se ha descrito previamente que la expresión del RP es menor en los CI metastásicos que en los que no lo son (Peña *et al.*, 2003a). En nuestro estudio, todos los tumores eran metastásicos en el momento de la determinación del RP, por lo que no hemos podido comprobar esta afirmación.

En estudios recientes se ha señalado que la expresión de **RA** es muy frecuente en los tumores mamarios de la mujer (Agrawal *et al.*, 2008), encontrándose en el 70-90% de los casos (Gonzalez *et al.*, 2008; Nahleh, 2008; Ogawa *et al.*, 2008). Estos resultados son similares, aunque ligeramente inferiores, a los que se han observado en nuestro estudio; en el que el RA se expresa en el 95% de los CI y en el 80% de los TMM no-CI, sin existir diferencias significativas entre la expresión de RA en ambos grupos. Nuestros resultados han sido prácticamente iguales a los observados previamente en los CI mamarios caninos (93%) y tumores mamarios caninos malignos no-CI (84%) (Illera *et al.*, 2006). Sin embargo, no podemos comparar con otros estudios en tumores mamarios no CI, porque hasta el momento no se han realizado más estudios de este tipo.

Se cree, que el RA tiene un papel fundamental en el proceso de carcinogénesis en los tumores mamarios de la mujer (Nahleh, 2008; Ogawa *et al.*, 2008); sin embargo, no está muy clara su función, puesto que algunos autores describen que la expresión de RA se asocia con procesos de baja malignidad (Ogawa *et al.*, 2008), mientras que otros la han asociado con tumores mamarios malignos invasivos, no invasivos, y con carcinomas altamente malignos (Moinfar *et al.*, 2003).

A pesar de no existir estudios que relacionen los andrógenos con el proceso de angiogénesis en los tumores mamarios humanos ni caninos, en líneas celulares y en cáncer experimental mamario en ratones se ha visto que los andrógenos inducen la expresión de VEGF-A en las células tumorales y pueden contribuir a la formación de nuevos capilares (Ruohola *et al.*, 1999). Nuestros resultados coinciden con este trabajo, ya que hemos

encontrado una asociación entre la expresión de RA y muchos factores relacionados con la angiogénesis tumoral, como el VEGF-A, VEGF-D, VEGFR-3 y COX-2 (considerando todos los tumores en conjunto), con VEGF-D y COX-2 (en los CI) y con VEGF-D (en los TMM no-CI). Por lo tanto, parece muy probable que el RA tenga un papel importante en el mecanismo de formación de nuevos vasos en los tumores mamarios caninos de elevada malignidad (GHM III).

La asociación de los receptores RE β , RP y RA con diversos factores angiogénicos en nuestros casos de CI, confirman los hallazgos previos en este tipo tumoral mamario (Peña *et al.*, 2003b; Illera *et al.*, 2006; Sanchez-Archidona *et al.*, 2007) que señalan que es posible un mecanismo endocrino especial en el CI canino. De acuerdo con nuestros datos, ese mecanismo especial endocrino podría estar dirigido hacia la angiogénesis tumoral y específicamente a promover la linfangiogénesis. La importancia de estos resultados sobre la implicación de las hormonas esteroides en el CI mamario canino, refuerza la necesidad de búsqueda de nuevas estrategias de tratamiento y/o terapias neoadyuvantes anti-hormonales, dirigidas hacia el bloqueo de la síntesis de las hormonas esteroides que se unen a estos receptores.

El marcaje inmunohistoquímico de los **factores relacionados con la angiogénesis** demostró que existen diferencias entre los tumores mamarios CI y los TMM no-CI, que podrían estar relacionadas con la mayor agresividad del CI mamario canino.

El papel de **VEGF-A** en la patogenia neoplásica no sólo está ligado a su capacidad angiogénica, sino también a su actividad anti-apoptósica (Xie *et al.*, 2004), a la linfangiogénesis (Baldwin *et al.*, 2002; Nagy *et al.*, 2002), a la inmunosupresión (Gabrilovich *et al.*, 1998; Ohm *et al.*, 1999; Ohm y Carbone, 2001; Ohm *et al.*, 2003) y a la estimulación y reclutamiento de precursores endoteliales y hematopoyéticos derivados de la médula ósea (Hattori *et al.*, 2001; Xie *et al.*, 2004).

Hasta el momento, no había trabajos en los que se hubiera estudiado la expresión de VEGF-A en el CI mamario canino. Nuestro estudio indica, por primera vez, que la inmunoexpresión de VEGF-A en los CI caninos es significativamente mayor que en los TMM no-CI. Este resultado concuerda con lo observado en los tumores mamarios caninos, en los que la mayor expresión de VEGF-A se ha relacionado con una mayor malignidad tumoral (Restucci *et al.*, 2004; Restucci *et al.*, 2002). En un estudio experimental de CI

mamario humano con ratones xenotransplantados de CI, en éstos también se ha observado una mayor expresión de VEGF-A que en los ratones xenotransplantados con otros tumores no-CI (Shirakawa *et al.*, 2002c). Por otro lado, en los tumores mamarios caninos se ha descrito que el crecimiento tumoral es más rápido cuanto mayores son los niveles de VEGF-A (Restucci *et al.*, 2002; Restucci *et al.*, 2004) y en medicina humana se ha asociado una elevada expresión de VEGF-A con un mayor índice de proliferación tumoral (Ki-67) (Fuckar *et al.*, 2006). En nuestro caso, la asociación entre VEGF-A y el índice de Ki-67 en los tumores del grupo CI, fue casi significativa ($p=0,06$), de manera que la elevada cantidad de este factor observada en los casos de CI parece colaborar en el crecimiento tumoral de estas neoplasias.

Diversos estudios en cáncer mamario de la mujer han señalado que existe un peor pronóstico en los casos que tienen una mayor expresión de VEGF-A (Gasparini *et al.*, 1997; Linderholm *et al.*, 1998, 1999; Linderholm *et al.*, 2000; Sledge y Miller, 2003). La elevada expresión de VEGF-A encontrada en los CI mamarios caninos, podría también estar implicada en la escasa supervivencia característica de las perras con CI mamario (Pérez-Alenza *et al.*, 2001).

De la misma manera que se ha descrito en los tumores mamarios de la mujer (Toi *et al.*, 1995; Hicklin y Ellis, 2005), la cantidad de VEGF-A en todos los tumores del estudio estuvo significativamente relacionada con la DMV ($p=0,05$). Sin embargo, cuando se calculó dicha relación por grupos tumorales (CI y TMM no-CI), no se encontró relación significativa entre la inmunoexpresión de VEGF-A y DMV. Teniendo en cuenta que la cantidad de VEGF-A y la DMV en el grupo de CI es muy elevada, sería esperable que ambos parámetros estuvieran asociados, aunque no ha sido así. Esta ausencia de asociación entre ambos factores podría deberse a la propia secuencia temporal de la angiogénesis, ya que la expresión de VEGF-A indica la futura formación de nuevos vasos que aún no han sido formados en el momento de análisis simultáneo de ambos factores. Nuestros resultados son similares a los publicados en los tumores mamarios caninos no CI (Millanta *et al.*, 2006b), aunque difieren de lo señalado en otro estudio (Restucci *et al.*, 2002), en el que encontraron asociación entre VEGF-A y la DMV. Esta disparidad de resultados podría deberse al uso de diferentes métodos de cuantificación.

Por otro lado, como hemos comentado para el cáncer mamario de la mujer, VEGF-A también se ha relacionado con un aumento de la linfangiogénesis (Baldwin *et al.*, 2002; Nagy *et al.*, 2002; Kunstfeld *et al.*, 2004). En nuestro estudio, no se han determinado la cantidad de vasos linfáticos de forma independiente de los vasos sanguíneos, pero sí hemos encontrado una asociación entre la inmunoexpresión de VEGF-A y los factores relacionados con la linfangiogénesis VEGF-D ($p=0,00$) y VEGFR-3 ($p=0,06$) en todos los tumores (CI y TMM no-CI). De acuerdo con el estudio multivariante, y seleccionando LV Ki-67 index como variable dependiente, VEGF-A fue seleccionada como variable independiente relacionada, lo que confirma su papel en el proceso de linfangiogénesis en los tumores mamarios caninos de elevada malignidad histológica.

El factor **VEGF-D** participa en los procesos de angiogénesis y linfangiogénesis en las neoplasias, incluyendo las mamas de la mujer (Achen *et al.*, 1998). Su principal acción la ejerce en el endotelio linfático (Olofsson *et al.*, 1999). No existen publicaciones previas sobre VEGF-D en los tumores mamarios caninos, el presente trabajo representa el primer estudio en la especie canina en el que se determina su expresión.

El estudio inmunohistoquímico demuestra que la cantidad de VEGF-D fue significativamente mayor en los tumores CI que en los TMM no-CI. En el CI de la mujer tampoco existen estudios inmunohistoquímicos de detección de VEGF-D. Se ha determinado la expresión de VEGF-D mediante PCR en tiempo real (RT-PCR) en un trabajo en ratones xenotransplantados con CI y ratones xenotransplantados con tumores no-CI, no encontrándose diferencias de expresión de VEGF-D entre ambos (Shirakawa *et al.*, 2001). Sin embargo, en la mayor parte de los estudios, tanto en cultivo de líneas celulares de tumores mamarios (Kurebayashi *et al.*, 1999) como en secciones de tejido mamario humano (Van der Auwera *et al.*, 2004), se cuantificó mediante RT-PCR una mayor expresión del VEGF-D en los CI, con respecto a los tumores mamarios no-CI.

Nuestros resultados muestran que VEGF-D está asociado con VEGF-A (en todos los tumores), con VEGFR-3 y COX-2 (CI), con la DMV (todos los tumores) y con la proliferación de los vasos linfáticos (LV Ki-67 index) (todos los tumores). Existen diversos estudios que describen el importante papel del VEGF-D, a través de su unión con el receptor VEGFR-3, en el desarrollo de los vasos linfáticos en los tumores mamarios de la mujer (Skobe *et al.*, 2001; Stacker *et al.*, 2001), de manera que la asociación existente entre VEGF-D y VEGFR-3 observada en los CI mamarios caninos de nuestro estudio podría

estar relacionado con el elevado poder linfangiogénico de este tipo tumoral (Van der Auwera *et al.*, 2004). La mayor expresión de VEGF-D, de acuerdo con estudios de CI humano (Kurebayashi, *et al.*, 1999), podría promover la diseminación de células neoplásicas dentro de los vasos linfáticos de la dermis superficial y podría inducir el cambio inflamatorio que se produce en la piel. Por otro lado, la asociación de este factor con la molécula de COX-2 en los CI, pero no en los TMM no-CI, podría explicar la elevada DMV de los casos CI, puesto que una de las acciones de la molécula de COX-2 en los tumores mamarios es la de participar en la angiogénesis (Tsujii *et al.*, 1998) y lo que podría ocurrir en estos casos es que a través de VEGF-D, COX-2 participara en la linfangiogénesis y, por tanto, en la elevada DMV. Puesto que VEGF-D participa en la angiogénesis y linfangiogénesis (Achen *et al.*, 1998), resulta extraño que no haya asociación ente VEGF-D y DMV y/o LV Ki-67 índice en el CI; sin embargo, a pesar de que la asociación no fue significativa, se observó una clara tendencia: a mayor expresión de VEGF-D, mayor es el valor de DMV y del índice LV Ki-67, de manera que es probable que esta asociación apareciera al aumentar el número de casos. En los TMM no-CI, también existe esta tendencia, pero menos evidente que la descrita en los CI.

El papel de VEGF-D en las metástasis de tumores mamarios es controvertido. Es posible que el hecho de que las células tumorales de los CI tengan una mayor expresión de VEGF-D induzca activamente la linfangiogénesis asociada al tumor y por tanto las metástasis linfáticas, como se ha descrito para VEGF-C. Sin embargo, podrían ser las propias células endoteliales linfáticas las que promueven la atracción de las células tumorales mediante citocinas y así, ayudar al proceso de metástasis por vía linfática, como se ha observado en estudios experimentales en melanoma (Wiley *et al.*, 2001). No está claro si el VEGF-D contribuye en las metástasis por estimulación del número de vasos linfáticos o por promover la hiperplasia y dilatación de los vasos linfáticos peritumorales (Alitalo y Carmeliet, 2002; Schoppmann *et al.*, 2004).

El receptor **VEGFR-3** se une específicamente a VEGF-C y VEGF-D. La acción de dicho receptor se ha asociado con el desarrollo y mantenimiento de los vasos linfáticos (Achen *et al.*, 1998; Salven *et al.*, 1998). También se ha demostrado que, además de en los vasos linfáticos, se expresa en vasos sanguíneos tumorales durante la angiogénesis (Partanen *et al.*, 1999; Valtola *et al.*, 1999; Nakamura *et al.*, 2003), incluso en los de los tumores mamarios de la mujer (Longatto Filho *et al.*, 2005) y de la especie felina (Sarli *et al.*, 2007) y que estimula la linfangiogénesis y angiogénesis (Stacker *et al.*, 2001).

Para conseguir una adecuada inmunotinción del VEGFR-3 empleamos un sistema ultrasensitivo de detección y revelado; a pesar de ello, la tinción fue bastante débil en todos los casos. Esto puede deberse a una inadecuada reacción cruzada del anticuerpo humano con el tejido de la especie canina. Sin embargo, consideramos los resultados útiles ya que, hasta la fecha, es el primer estudio en el que se valora la expresión de VEGFR-3 en los tejidos caninos (incluyendo los tumores mamarios y CI) y sólo existe un estudio previo en la especie felina (Sarli *et al.*, 2007) realizado en tumores mamarios, sin incluir CI. Los resultados, con respecto a los CI y TMM no-CI, fueron similares a lo descrito previamente en los tumores mamarios de la mujer (Shirakawa *et al.*, 2001; Shirakawa *et al.*, 2002c; Bieche *et al.*, 2004), ya que se determinó mediante RT-PCR que no existían diferencias significativas en cuanto a la expresión de VEGFR-3 entre los CI y no-CI. Sin embargo, los datos que existen sobre este factor en los tumores mamarios de la mujer son contradictorios, porque en otro estudio sí se encontraron diferencias entre CI y TMM no-CI, siendo mayor la expresión en CI (Van der Auwera *et al.*, 2004). En el estudio de los tumores mamarios felinos (Sarli *et al.*, 2007) se observó que VEGFR-3 se expresaba en los vasos linfáticos de los tumores malignos, benignos y también en la mama normal y neoplásica, relacionándose la expresión con la malignidad histológica de los carcinomas.

Aunque, como hemos comentado previamente, se ha detectado la presencia de VEGFR-3 en los vasos linfáticos y sanguíneos de los tumores mamarios humanos (Longatto Filho *et al.*, 2005) y felinos (Sarli *et al.*, 2007), en nuestras muestras hemos observado que la tinción de los mismos fue irregular, ya que no se tiñeron todos los vasos presentes, aunque se detectó mayor cantidad de vasos linfáticos que sanguíneos. Este resultado es el mismo que se describió en los tumores mamarios felinos (Sarli *et al.*, 2007). Por lo tanto, pensamos que el VEGFR-3, no es un buen marcador para la detección de vasos linfáticos en la mama canina.

Como ya se ha comentado previamente, VEGFR-3 se asoció con VEGF-D en los CI, en los que puede estar en relación con el elevado poder linfangiogénico de los CI. Además, en los CI estuvo asociado a la molécula de COX-2; de manera que COX-2 podría estar participando en la angiogénesis y linfangiogénesis en estos tumores, también a través de VEGFR-3. Por otro lado, a pesar de no existir asociación significativa entre VEGFR-3 con la DMV y el LV Ki-67 index en los CI, la tendencia que se observó fue que a mayor expresión de VEGFR-3, mayor era el valor de la DMV y del índice de proliferación LV Ki-67, similar a lo descrito en un estudio de humana, en el que se relacionó VEGFR-3 con

la angio- y linfangiogénesis de los tumores mamarios (Longatto Filho *et al.*, 2005). En los TMM no-CI, VEGFR-3 se asoció con LV Ki-67 índice; pero la DMV no aumentaba gradualmente con el aumento de expresión de VEGFR-3, como ocurría en los CI. Podría ser que VEGFR-3 estuviera más relacionado en el proceso de angiogénesis en los CI que en los TMM no-CI. En el estudio multivariante, VEGFR-3 se asoció de forma independiente con DMV (tomando todos los tumores de forma conjunta) y con LV Ki-67 índice en los TMM no-CI.

Con respecto a la producción de metástasis y el valor pronóstico de VEGFR-3, los resultados de los estudios de medicina humana son dispares, algunos estudios avalan la asociación entre este receptor y el desarrollo de metástasis (Nakamura *et al.*, 2003), mientras otros autores no encuentran dicha evidencia (Gunningham *et al.*, 2000; Jacquemier *et al.*, 2000; Longatto Filho *et al.*, 2005; Bando *et al.*, 2006). En el estudio de los tumores mamarios felinos (Sarli *et al.*, 2007), sí encontraron relación entre la mayor expresión de este factor y la mayor presencia de metástasis. Todas las perras incluidas en nuestra investigación presentaron metástasis en necropsia, por lo que no podemos asociar VEGFR-3 con mayor o menor probabilidad de desarrollar metástasis a distancia.

La molécula **COX-2** es una enzima encargada del proceso de biosíntesis de prostaglandinas y tromboxanos (Ueno *et al.*, 2006) que no se expresa de forma constitutiva, sino que es inducida por factores de crecimiento, citocinas, promotores tumorales, estímulos inflamatorios y muchos otros mediadores (O'Banion *et al.*, 1992). La expresión inmunohistoquímica de COX-2 en los tumores mamarios humanos se calcula que está alrededor del 40% (Ristimaki *et al.*, 2002; Denkert *et al.*, 2003; Spizzo *et al.*, 2003; Wulfing *et al.*, 2003). También se ha descrito su presencia en los tumores mamarios caninos (Dore *et al.*, 2003; Mohammed *et al.*, 2004; Heller *et al.*, 2005; Queiroga *et al.*, 2005; Brunelle *et al.*, 2006; Millanta *et al.*, 2006a). En nuestro estudio, debido a que la inmunotinción fue heterogénea dentro de un mismo tejido tumoral, se estableció el criterio descrito en el apartado de material y métodos para la valoración de la inmunotinción de COX-2, mediante el cual se tuvo en cuenta la intensidad de la inmunoexpresión y el porcentaje de células positivas a la inmunotinción. Según dicho criterio, la mayoría de los CI y los TMM no-CI expresan COX-2, encontrando un porcentaje de expresión superior al 40% descrito para la mujer. Teniendo en cuenta los dos grupos tumorales (CI y TMM no-CI) y la intensidad de la inmunoexpresión, las cantidades de COX-2 fueron significativamente mayores ($p=0,046$) en el grupo CI que en el no-CI. El hecho de que

prácticamente todos nuestros casos expresen COX-2 resulta lógico, puesto que se ha descrito que esta molécula participa en determinados pasos clave de la carcinogénesis (Rozic *et al.*, 2001; Singh y Lucci, 2002; Zha *et al.*, 2004). Además, en los tumores mamarios caninos no-CI se ha detectado que la expresión de COX-2 mediante inmunohistoquímica (Dore *et al.*, 2003; Mohammed *et al.*, 2004; Heller *et al.*, 2005; Brunelle *et al.*, 2006; Millanta *et al.*, 2006a; Queiroga *et al.*, 2007), ELISA (Queiroga *et al.*, 2005; Brunelle *et al.*, 2006) y radioinmunoensayo (Brunelle *et al.*, 2006) es mayor cuanto mayor es la agresividad tumoral y menor es la diferenciación de las células neoplásicas. Así pues, es normal el elevado porcentaje de positividad a COX-2 detectado en nuestros casos, ya que todos ellos son tumores malignos de GHM III. A su vez, es razonable que los CI contengan mayores proporciones de COX-2, porque son más agresivos que los TMM no-CI. De hecho, nuestros resultados son semejantes a los del único estudio publicado que incluye tumores mamarios caninos CI, en el cual se comparan los niveles de COX-2 entre CI y no CI, mediante ELISA (Queiroga *et al.*, 2005) y se comprueba que la expresión de COX-2 es significativamente mayor en los CI.

Entre otros muchos efectos en los que COX-2 interviene en los procesos tumorales, la importancia de su papel en la angiogénesis tumoral ha sido relativamente estudiada y se asocia con este proceso en la mayoría de los tumores (Masferrer *et al.*, 2000). Además, se ha descrito en el cáncer mamario una relación entre la presencia de COX-2 y la linfangiogénesis (Timoshenko *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2008).

En nuestro estudio, dentro de los TMM no-CI, COX-2 podría estar asociado con el proceso de angiogénesis tumoral a través del factor VEGF-A; por ello, COX-2 se encuentra asociado con VEGF-A y con la DMV (aunque no significativamente). Sin embargo, parece que en estos tipos tumorales (TMM no-CI), el efecto sobre el proceso de linfangiogénesis es menor que el observado para los CI, ya que COX-2 no se encuentra asociada con ninguno de los factores relacionados con la formación de vasos linfáticos en los procesos tumorales (VEGF-D, VEGFR-3), ni con la proliferación de los mismos (LV Ki-67 índice). Nuestros resultados, son semejantes a lo descrito en los tumores mamarios de la mujer, en los que se ha observado que una asociación entre COX-2 y VEGF-A, provocaba un aumento significativo de la angiogénesis evaluado por la medición de la DMV (Costa *et al.*, 2002; Kirkpatrick *et al.*, 2002). En las neoplasias del grupo CI, COX-2 se encuentra estadísticamente asociado a VEGF-D y VEGFR-3, factores que se encuentran mayoritariamente asociados al endotelio linfático (Achen *et al.*, 1998; Salven *et al.*, 1998).

Por tanto, COX-2 podría estar relacionado con el fenómeno de angiogénesis mediado por el factor VEGF-D y/o VEGFR-3, en los CI mamarios caninos, lo que nos indica que mayoritariamente estaría mediando un proceso de linfangiogénesis. COX-2 se relacionó con la DMV (aunque no de manera significativa) y podría ser la consecuencia de la elevada cantidad de COX-2 y VEGF-D en los CI, que producen una gran cantidad de vasos linfáticos, reflejado en un aumento de la DMV (que contabiliza los vasos sanguíneos y linfáticos). Este resultado también es similar a lo observado en medicina humana (Timoshenko *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2008), donde se ha descrito que COX-2 se asocia a factores de crecimiento relacionados con la linfangiogénesis, aunque en ese caso se trataba del VEGF-C. Por último, puesto que COX-2 produce un incremento de la proliferación tumoral (índice de Ki-67), e inhibición de la apoptosis (Tsuji y DuBois, 1995) y se encuentra relacionado con la linfangiogénesis (Timoshenko *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2008), es lógico que nuestros resultados muestren una asociación entre un aumento de COX-2 y un aumento de la proliferación de los vasos linfáticos (LV Ki-67 index) en los casos de CI, que contienen grandes cantidades de COX-2 y de factores de linfangiogénesis. Por último, el estudio multivariante demuestra que COX-2 se asocia de forma independiente con LV Ki 67, considerando todos los tumores y en el grupo TMM no-CI.

Por otro lado, hay un estudio que demuestra la capacidad de las células tumorales de cáncer mamario de mujer que contienen grandes cantidades de COX-2 para formar canales de mimetismo vascular (MV) y que, por el contrario, aquellas que contienen menores cantidades de COX-2 no son capaces de dar lugar a este fenómeno de vascularización (Basu *et al.*, 2006). Esta teoría, junto con la elevada expresión de COX-2 por parte de las células neoplásicas y ELCs y el elevado porcentaje de casos con MV en el grupo CI de nuestro estudio nos llevan a proponer que COX-2 podría estar directamente relacionado con el fenómeno del mimetismo vascular también en los CI mamarios caninos.

En los tumores mamarios humanos se ha descrito la relación entre una elevada expresión de COX-2 y un aumento de las metástasis al ganglio regional (Costa *et al.*, 2002; Ristimäki *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2008). En los tumores mamarios caninos, se ha asociado con las metástasis a distancia (Queiroga *et al.*, 2005). En nuestro estudio, todos nuestros casos presentaron metástasis al ganglio regional y a distancia en el momento de la determinación de COX-2; sin embargo, pensamos que COX-2 debe tener una influencia importante en la producción de metástasis, puesto que favorece la angiogénesis (en CI y TMM no-CI) y, en el caso concreto de los CI, podría tener un efecto mayor en la

producción de metástasis a través de los vasos linfáticos o de los canales de mimetismo vascular en cuya formación parece intervenir.

Aunque no se sabe mucho acerca de la regulación hormonal de COX-2, se ha descrito que su expresión es más frecuente en los tumores mamarios de mujer RE y RP negativos (Singh y Lucci, 2002; Singh *et al.*, 2005; Mohammad *et al.*, 2006). En nuestros casos se observó una asociación con algunos receptores hormonales, como se ha descrito anteriormente.

Para determinar si las células tumorales y ELCs expresan **marcadores de células endoteliales** y determinar qué marcador es el más efectivo para la detección de células endoteliales, llevamos a cabo la evaluación de una serie de marcadores de células endoteliales como el Factor von Willebrand (vWF), las proteínas CD31 y CD34 y la molécula D2-40.

vWF fue el primer marcador específico de células endoteliales que comenzó a utilizarse para la detección de los microvasos tumorales (Folpe y Gown, 2001). En los tumores mamarios de la mujer, ha sido empleado en gran cantidad de estudios existen alrededor de 30 referencias bibliográficas en las que se ha empleado este marcador para el estudio de la angiogénesis tumoral (*ver artículo de revisión* Uzzan *et al.*, 2004; Bhati *et al.*, 2008; Sullivan *et al.*, 2008). Por el contrario, son escasos los estudios de detección de microvasos en los que se emplea este marcador en las neoplasias de la especie canina (von Beust *et al.*, 1988; Coomber *et al.*, 1998; Ranieri *et al.*, 2003; Preziosi *et al.*, 2004; Luong *et al.*, 2006), incluyendo en los tumores mamarios (Griffey *et al.*, 1998; Graham y Myers, 1999).

El vWF se encuentra en todas las células endoteliales (Ruggeri y Ware, 1993; Rodeghiero, 2002) y por ello se pudo observar la inmunoexpresión de este factor tanto en las células endoteliales sanguíneas, como en las linfáticas; pero también en algunas células tumorales de los CI y TMM no-CI y en las células epiteliales de la glándula mamaria normal. Debido a que la tinción de los microvasos no fue regular, puesto que algunos vasos no se encontraban marcados y a la inesperada expresión de vWF por parte de células epiteliales tumorales y de la mama normal, pensamos que el anticuerpo anti-vWF usado en este estudio no puede considerarse un marcador endotelial apropiado para los tejidos mamarios caninos. En nuestra opinión esto podría deberse a la baja especificidad y

sensibilidad atribuida a este anticuerpo en tumores de los tejidos blandos del hombre (Folpe y Gown, 2001).

A pesar de que el vWF ha sido uno de los primeros anticuerpos utilizados para la detección de vasos, actualmente no es el anticuerpo de elección para la determinación de vasos en medicina humana, sino que es el anticuerpo anti-CD31 el más efectivo para este objetivo (Horak *et al.*, 1992; Toi *et al.*, 1993; Vermeulen *et al.*, 1996; Giatromanolaki *et al.*, 1997; Martin *et al.*, 1997; Montrucchio *et al.*, 1998;).

La proteína **CD31** se expresa en todos los endotelios continuos (Muller, 1996), de manera que es un marcador de vasos sanguíneos y linfáticos. Se ha utilizado para la detección de la microvascularización en numerosos estudios de tumores mamarios de la mujer, existiendo hasta la actualidad unas 20 publicaciones (*ver artículo de revisión* Uzzan *et al.*, 2004; Charpin *et al.*, 2004; Mohammed *et al.*, 2007b; El-Gohary *et al.*, 2008; Pavlakis *et al.*, 2008; Sullivan *et al.*, 2008). Sin embargo, en los tumores de la especie canina no existen tantos estudios de este tipo (Maiolino *et al.*, 2001; Luong *et al.*, 2006), incluyendo en los tumores mamarios caninos (Restucci *et al.*, 2000). En todas nuestras muestras tumorales (CI y TMM no-CI), la tinción con CD31 fue específica de las células endoteliales y muy sensible, puesto que la tinción de la microvascularización de cada una de las muestras tumorales fue prácticamente total. En relación con esta alta calidad de inmunotinción, debemos destacar que tuvimos que emplear un sistema de detección y revelado especial ultrasensitivo, puesto que con los métodos de detección convencionales la calidad de la inmunotinción era pobre y no se marcaban todos los vasos. Todas las células tumorales y de la mama normal fueron negativas, a excepción de algunas ELCs que presentaron una ligera inmunotinción. Aunque la mayoría de las células tumorales fueron negativas a CD31 en nuestro trabajo, en otros tipos tumorales se ha detectado un aumento de expresión de CD31 en células tumorales altamente agresivas de la mama (Hendrix *et al.*, 2000).

La bibliografía consultada destaca a CD31 como el mejor marcador para determinar la densidad microvascular (Horak *et al.*, 1992; Toi *et al.*, 1993; Giatromanolaki *et al.*, 1997; Martin *et al.*, 1997; Montrucchio *et al.*, 1998). Al igual que se ha descrito en medicina humana (Giatromanolaki *et al.*, 1997), el CD31 es un método más sensible que el vWF, pues detecta incluso pequeños vasos inmaduros o células endoteliales aisladas. Por todo ello, pensamos que se trata de un buen marcador de células endoteliales sanguíneas y

linfáticas y que, hoy en día, es la mejor elección para detectar microvasos en los tumores mamarios caninos.

La proteína **CD34** se expresa en las células endoteliales (Fina *et al.*, 1990) y por ello, al igual que el vWF y que CD31, ha sido utilizada para la detección de la densidad vascular en diferentes tipos tumorales, aunque existen menos estudios en tumores mamarios en los que se ha empleado CD34 para detectar la microvascularización que los estudios que emplean vWF y CD31 (ver artículo de revisión Uzzan *et al.*, 2004; Hansen *et al.*, 2004; da Silva *et al.*, 2006; Fox, 2006; Milias *et al.*, 2007; Popiela *et al.*, 2008; Sullivan *et al.*, 2008). En las neoplasias de la especie canina, incluyendo los tumores mamarios, no existen estudios previos en los que se haya empleado el anticuerpo anti-CD34 para detectar la vascularización. El uso de CD34 es una alternativa aceptable para muchos laboratorios; sin embargo, al igual que se había descrito previamente en medicina humana (Traweek *et al.*, 1991), pudimos apreciar que es poco específico, puesto que muchas de las células del estroma expresan CD34. Además, alguna de las células tumorales (18%) del grupo CI expresaron CD34; probablemente podría ser porque se trata de células muy indiferenciadas. Por otro lado, observamos que la sensibilidad fue baja, puesto que no se encontró inmunexpresión en todos los microvasos presentes en las muestras tumorales (CI y TMM no-CI). En definitiva, no recomendamos el uso de CD34 para la determinación de la densidad vascular ni para la detección de células endoteliales en los tumores mamarios caninos.

Además de estimar la DMV, para evaluar la densidad de vasos linfáticos presentes en los CI y en los TMM no-CI, empleamos el marcador específico de vasos linfáticos D2-40, que ha demostrado ser sensitivo y específico en muchos tejidos (Evangelou *et al.*, 2005) y especialmente en los tumores mamarios (Choi *et al.*, 2005; Van der Auwera *et al.*, 2005; Marinho *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2008), considerándose el mejor anticuerpo para detección de vasos linfáticos en los CI mamario (Van der Auwera *et al.*, 2005). Sin embargo, hemos comprobado que el tejido tumoral mamario de la especie canina no tenía reactividad cruzada con el anticuerpo anti-D2-40 empleado. La técnica inmunohistoquímica que estábamos empleando era correcta, ya que el control positivo, una muestra de tejido procedente de un tumor mamario maligno de mujer, que por H-E mostraba gran cantidad de vasos linfáticos resultó positivo al marcaje por D2-40 en todos los vasos linfáticos de forma específica. Por lo tanto, a pesar de que D2-40 parece un

anticuerpo sensible y específico para la determinación de los vasos linfáticos, no se recomienda su uso para la detección de éstos en los tumores mamarios caninos.

La **densidad microvascular** (DMV) ha sido evaluada en diversos estudios de tumores mamarios de la mujer, puesto que es un parámetro que refleja la neovascularización tumoral a través de la angio- y linfangiogénesis (Horak *et al.*, 1992; Weidner *et al.*, 1992). Sin embargo, existe escasa documentación en oncología veterinaria y éste es el primer estudio en el que se mide la DMV en el CI mamario canino.

De forma similar a lo descrito en los dos únicos estudios realizados en el CI mamario humano (McCarthy *et al.*, 2002; Colpaert *et al.*, 2003), en los que la DMV fue significativamente mayor en los CI, que en las neoplasias mamarias no-CI, en nuestro estudio se ha observado que la cantidad media de vasos (DMV) presentes en los CI mamarios fue significativamente mayor que en los TMM no-CI ($p=0,010$). A pesar de no existir estudios previos de este tipo en CI mamario canino, los resultados que obtuvimos coinciden con lo observado en tumores mamarios caninos no-CI (Griffey *et al.*, 1998; Graham y Myers, 1999; Restucci *et al.*, 2000; Restucci *et al.*, 2002), en los que se señala que la DMV es mayor en las lesiones malignas que en las benignas y que es mayor cuanto más anaplásico es el proceso tumoral. Podría surgir la duda de si el valor de la DMV en los CI mamario canino es mayor que en los casos de TMM no-CI debido a la elevada presencia del fenómeno de MV en los CI; sin embargo, no es probable puesto que las ELCs fueron negativas al marcaje con CD31 en todos los casos, a excepción de uno, como comentaremos más detenidamente a continuación.

Las relaciones existentes entre el valor de DMV y los diferentes factores relacionados con la angiogénesis se han comentado a lo largo de esta discusión; destacamos que el elevado valor de la DMV en el grupo CI, podría estar influido por las mayores expresiones de VEGF-A y VEGF-D que se observaron en este grupo. Por otro lado, el efecto de una alta DMV en el pronóstico y en la producción de metástasis no está claro, puesto que los datos obtenidos de los estudios de tumores mamarios caninos son dispares, a favor (Restucci *et al.*, 2002) y en contra (Millanta *et al.*, 2006b) de dicha asociación, debido a los diferentes tipos tumorales evaluados y a los diferentes métodos de detección de los microvasos tumorales. En nuestro estudio, no evaluamos el factor pronóstico de la DMV. La relación con la existencia de metástasis no se pudo realizar porque todos los casos presentaron metástasis. Sin embargo, pensamos que sería lógico que la DMV estuviera

relacionada con la mayor y más rápida producción de metástasis y, por tanto, con un peor pronóstico de la enfermedad, puesto que si en el tumor hay un mayor número de vasos, se favorece el crecimiento del mismo (por aporte de oxígeno y nutrientes) y posiblemente la diseminación de las células tumorales por vía vascular y/o linfática. De hecho, esta elevada DMV en los CI, podría influir en el mal pronóstico y la gran capacidad de metastatizar de este tipo tumoral (Pérez-Alenza *et al.*, 2001).

El cáncer inflamatorio mamario de la mujer (Kleer *et al.*, 2000) y de la perra (Pérez-Alenza *et al.*, 2001) muestra una marcada dispersión linfática en la mama y particularmente en los vasos linfáticos de la dermis. Además, prácticamente todos los pacientes con este tipo de cáncer presentan metástasis en los ganglios regionales cuando éste se diagnostica (Kleer *et al.*, 2000; Pérez-Alenza *et al.*, 2001). Debido a la importancia de los vasos linfáticos en este tipo tumoral, en el CI mamario de la mujer se han realizado estudios que han intentado cuantificar el proceso de linfangiogénesis (Van der Auwera *et al.*, 2004; Van der Auwera *et al.*, 2005). Hasta la fecha no existen datos a este respecto en los tumores mamarios caninos, incluyendo el CI mamario. Mediante el estudio de proliferación de las células endoteliales linfáticas (**LV Ki-67 index**) en los CI y TMM no-CI, hemos observado un valor de dicho índice significativamente mayor en los CI que en los TMM no-CI ($p=0,028$) y de éstos con respecto a la mama normal. Este resultado se enlaza con la mayor expresión del factor linfangiogénico VEGF-D en el CI mamario canino. Estos resultados coinciden con lo observado en los tumores mamarios de la mujer (CI y no-CI) (Van der Auwera *et al.*, 2004; Van der Auwera *et al.*, 2005) en los que también observaron que la media del valor del LV Ki-67 index era significativamente mayor en los CI mamarios que en los no CI (Van der Auwera *et al.*, 2005). Por analogía con el proceso de angiogénesis (Vermeulen *et al.*, 2002), la proliferación de células endoteliales linfáticas es el reflejo de la linfangiogénesis que se está produciendo en una neoplasia (Van der Auwera *et al.*, 2005), de hecho, nuestros resultados mostraron que existía una asociación significativa entre un aumento del valor de LV Ki-67 index y de la DMV ($p=0,045$).

La relación existente entre el LV Ki-67 index y los diferentes factores de angiogénesis ha sido comentada a lo largo de la presente discusión. Aunque no hemos encontrado estudios acerca de la influencia directa de las hormonas en la linfangiogénesis, parece lógico pensar que los efectos hormonales se podrían dirigir, no sólo hacia la

angiogénesis, sino también hacia la linfangiogénesis, como hemos comentado anteriormente.

La mayor linfangiogénesis existente en el CI de la mujer sugiere que este fenómeno contribuye a la dispersión del proceso tumoral (Van der Auwera *et al.*, 2005). Sin embargo, aún no existen estudios en los que se estudie la asociación del valor del LV Ki-67 índice con la probabilidad de desarrollar metástasis. Como ya hemos comentado, en nuestros casos no se pudo valorar porque todos eran metastásicos.

Es un hecho ampliamente conocido que los tumores requieren un aporte sanguíneo suficiente para su crecimiento y para producir metástasis (Folkman, 1995) y que para ello forman nuevos vasos mediante el mecanismo de angiogénesis (Kumar *et al.*, 2005). Sin embargo, desde hace aproximadamente una década, cuando Maniotis *et al.*, (1999) descubrieron el fenómeno de **mimetismo vascular** en el melanoma ocular humano, algunos autores (Maniotis *et al.*, 1999; Folberg *et al.*, 2000; Shirakawa *et al.*, 2001; Sood *et al.*, 2001; Kobayashi *et al.*, 2002) comenzaron a proponer que los tumores podrían alimentarse a través de canales vasculares creados por las propias células tumorales, mediante este mecanismo independiente de la tradicional angiogénesis. Desde entonces, en medicina humana se ha comenzado a estudiar la posible presencia de MV en diferentes tipos tumorales y los mecanismos implicados en este mecanismo especial de vascularización, pero aún existe escasa información acerca de los factores implicados y de las características que tienen las células formadoras de esos canales (ELCs). Hasta el momento, además de en el melanoma y en el CI mamario, se ha demostrado la evidencia de MV en diversas neoplasias humanas de elevada malignidad, de forma experimental (Sood *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2002; Sharma *et al.*, 2002) y/o a partir de la observación directa en muestras tisulares de tejido humano (Sood *et al.*, 2001; Favier *et al.*, 2002; Hao *et al.*, 2002; Hao *et al.*, 2003; Sun *et al.*, 2004; Guzman *et al.*, 2007). No existen estudios acerca de este tipo especial de vascularización en ninguna clase de neoplasia de especies animales, incluyendo los tumores mamarios caninos y el CI mamario. Por lo tanto, el presente trabajo es el primero en Medicina Veterinaria que considera la evidencia de ELCs y su relación con el MV.

La experiencia previa de nuestro equipo en la observación histopatológica del cáncer mamario inflamatorio canino nos permitió detectar algunas células neoplásicas con características histológicas que se asemejan a células endoteliales (ELCs), posiblemente relacionadas con el fenómeno del mimetismo vascular. Basándonos en esa hipótesis, nos propusimos investigar la posible presencia de ELCs en los tumores mamarios caninos (CI y TMM no-CI) y caracterizar su inmunofenotipo mediante inmunohistoquímica. Para ello incluimos 42 muestras de neoplasias mamarias caninas malignas (22 muestras CI y 20 muestras de TMM no-CI) para detectar la presencia de MV mediante H-E, inmunohistoquímica y microscopía electrónica. Como resultado, células neoplásicas altamente malignas semejantes a endoteliales formando pequeños capilares (ELCs) en 7 de los 22 casos (31,8%) de CI y en 1 de los 20 (5%) casos de TMM no-CI. Este resultado es similar a lo observado previamente en modelos *in vivo* en ratones xenotransplantados con CI humano y tumores mamarios no CI, comprobándose la presencia de MV en los modelos de CI pero no en los modelos de TMM no-CI (Shirakawa *et al.*, 2001; Shirakawa *et al.*, 2002b; Shirakawa *et al.*, 2003). En estudios *in vitro* demostraron que se formaban canales de MV exclusivamente en los cultivos de células de CI y no en los de células de TMM no-CI (Shirakawa *et al.*, 2001). Nuestros resultados están más acorde con lo señalado en un estudio realizado con cortes histológicos de tumores mamarios humanos en el que se detectó la presencia de MV en el 15,8% de los CI y en el 7,4% de los TMM no-CI (Shirakawa *et al.*, 2002d). Asimismo, en otro estudio se detectó MV en un TMM no-CI de mujer y en sus metástasis ganglionares (Buijs *et al.*, 2004). Estos resultados sugieren que el mimetismo vascular es un proceso que no es específico de los CI humanos, aunque sí mucho más frecuente. De igual forma, según nuestros resultados, el MV es un proceso que aparece de forma más frecuente en los CI caninos (32%) que en los TMM no-CI (5%), pero no es exclusivo de los CI mamarios caninos.

Teniendo en cuenta nuestros hallazgos, el proceso de mimetismo vascular tampoco es exclusivo de un tipo histológico, aunque la mayor proporción (38%) se encontró en carcinomas anaplásicos, posiblemente porque se trata del tipo histológico más indiferenciado (Misdorp *et al.*, 1999).

La inmunotinción de las ELCs confirmó su origen epitelial neoplásico, puesto que fue la misma que la que presentaron las células tumorales de los tumores seleccionados y, en todos los casos, resultó intensamente positiva a citoqueratinas. Casi en el 90% de los casos, las ELCs fueron positivas a la inmunotinción con vimentina, al igual que sucedió con la mayoría de las células neoplásicas del mismo tumor. La co-expresión de citoqueratinas y vimentina podría estar relacionada con una mayor indiferenciación y agresividad, como hemos descrito previamente. Este mismo fenómeno se ha descrito previamente en casos de melanoma con MV (Folberg *et al.*, 2000). Las ELCs de nuestro estudio fueron negativas a actina de músculo liso y desmina, como era esperable en células de origen epitelial, descartando su formación a partir de células mioepiteliales que, como hemos indicado anteriormente, es un tipo celular que no suele participar en el desarrollo del CI canino.

La tinción inmunohistoquímica con los marcadores endoteliales específicos vWF, CD31 y CD34 no fue concluyente, aunque podríamos decir que fue mayoritariamente negativa, únicamente algunas ELCs se tiñeron con una intensidad variable a vWF, sólo en un caso algunas de las ELCs se tiñeron ligeramente con CD31 y todas las ELCs analizadas fueron negativas a CD34. Como se ha descrito previamente, creemos que la tinción de vWF fue inespecífica (Folpe y Gown, 2001), puesto que también tiñe de forma irregular las células epiteliales normales y neoplásicas, así pues, la tinción de algunas ELCs con este marcador es, en los tumores mamarios estudiados, una característica de célula neoplásica y no de célula endotelial. Por tanto, la ausencia de inmunoreacción específica de las ELCs a los diferentes marcadores endoteliales, confirma el origen neoplásico de estas células y está en concordancia con otros estudios sobre ELCs en tumores mamarios y en otros tipos tumorales. Se ha descrito que la inmunotinción de las células de MV en neoplasias mamarias humanas no-CI (Buijs *et al.*, 2004) fue negativa al vWF. Asimismo, en melanomas oculares (Maniotis *et al.*, 1999) los tumores fueron mayoritariamente negativos, aunque algunas células que formaban parte de los canales de MV fueron positivas a este marcador. Con respecto al marcador endotelial CD31 existen resultados contradictorios, en un estudio realizado con ratones xenotranplantados de CI mamario se describió, que algunas células del MV fueron positivas a CD31 (Shirakawa *et al.*, 2001), pero en posteriores estudios *in vivo* de este mismo grupo investigador (Shirakawa *et al.*, 2002d) se ha observado que estas células eran negativas a CD31. Por otro lado, al igual que lo observado en el presente trabajo, en el melanoma ocular (Maniotis *et al.*, 1999) y en un

estudio de carcinoma mamario humano no-CI (Buijs *et al.*, 2004) consideraron las células de MV mayoritariamente negativas a CD31. Asimismo, en otros tipos tumorales como el carcinoma hepatocelular (Guzman *et al.*, 2007) y el sarcoma de Ewing (van der Schaft *et al.*, 2005), se ha observado que las ELCs fueron siempre negativas a CD31. Por último, se ha descrito que estas células son negativas a CD34 en melanomas (Maniotis *et al.*, 1999) y sarcomas de Ewing (van der Schaft *et al.*, 2005), no habiendo estudios previos al nuestro en casos de tumores mamarios caninos CI y/o no-CI.

El estudio de microscopía electrónica permitió comprobar que las ELCs no contenían cuerpos de Weibel-Pallade, que son estructuras características y diferenciales de las células endoteliales (Weibel y Palade, 1964). En los canales formados por varias ELCs, éstas se unían mediante desmosomas, estructura de unión característica de las células epiteliales, a diferencia de las células endoteliales que se unen por uniones íntimas, de tipo *fascia occludens* (Young y Heath, 2006). Además, se observó cómo las células neoplásicas, los glóbulos rojos y/o los linfocitos y neutrófilos observados dentro de los canales formados por las ELCs, no se encontraban en el interior de vacuolas, como ocurre en los casos de emperipolesis (Shamoto, 1981; Saxena *et al.*, 2002) o de fagocitosis (Kumar *et al.*, 2005), sino que estas células se encontraban libres en el interior del espacio/canal formado por la/las ELCs. Otro hecho que confirma que la presencia de estas células que no se debe a un mecanismo de fagocitosis, es el hecho de que para ello es necesaria la polimerización de filamentos de actina (Kumar *et al.*, 2005) y las ELCs fueron negativas a éste marcador. La técnica histoquímica de Sudán III demostró la ausencia de lípidos en el interior de las ELCs. Este dato se confirmó mediante la observación por microscopía electrónica, en la que se observó que el espacio interior es real, formado por membrana citoplasmática y sin presencia de lípidos.

Como se ha comentado anteriormente, la aparición de MV en el CI mamario es mucho más frecuente que en los tumores mamarios malignos no-CI, este hecho podría estar relacionado con la indiferenciación de las células tumorales y la abundancia de sustancias angiogénicas que podrían “provocar” el fenotipo endotelial en las células tumorales.

En las ELCs es muy característico encontrar en el interior de los huecos/canales células tumorales de marcada malignidad histológica (además de encontrarse células sanguíneas, como glóbulos rojos o leucocitos). Dichas células tumorales pueden, a su vez, presentar un hueco central y asemejar otra ELC en lo que podría definirse como un “ciclo sin fin”. Esta continua invasión de células tumorales en los huecos de ELCs podría ser un reflejo aberrante del elevado angiotropismo que caracteriza a los CI, pero, en este caso, en vez de penetrar en verdaderos vasos linfáticos, lo hacen en falsos canales de MV o ELCs individuales.

Como hemos indicado, la formación de ELCs y el fenómeno de MV podría estar influido por la presencia de un alto contenido en factores de crecimiento angiogénico en los CI (VEGF-A y VEGF-D, fundamentalmente) y su acción podría estar mediada por COX-2.

En un estudio en ratones xenotransplantados con tumores mamarios CI y no-CI, se observó que la cantidad de VEGF-A era mayor en los casos con MV que en los que no tenían MV (Shirakawa *et al.*, 2002d) y se ha demostrado que sólo aquellas células que contienen elevadas concentraciones de COX-2 son capaces de formar canales de MV (Basu *et al.*, 2006). Es importante destacar que todas las ELCs de los tumores de nuestro estudio mostraron una marcada inmunoexpresión de COX-2.

Como hemos comentado, la elevada presencia de ELCs en los CI caninos, en comparación con los TMM no-CI, podría estar relacionada con la elevada capacidad linfangiogénica que hemos observado y con el típico angiotropismo metastático de este tipo tumoral, más que con fenómenos de verdadera nutrición del tumor a través de estos canales de MV. Como hemos podido comprobar, existen mayores proporciones de diversos factores relacionados con la angiogénesis en general (VEGF-A, COX-2 y DMV) y linfangiogénesis en concreto (VEGF-D y LV Ki-67 índice) en los tumores caninos del grupo CI que en los del grupo TMM no-CI. Además, en los CI caninos los factores de linfangiogénesis VEGF-D y VEGFR-3 estaban relacionados con el factor COX-2, que está íntimamente relacionado con los procesos de angiogénesis (Tsuji *et al.*, 1998; Rozic *et al.*, 2001). Todo ello, y la escasa presencia de glóbulos rojos en su interior, induce a pensar que los canales de MV que se forman en los tumores mamarios caninos altamente malignos podrían simular vasos linfáticos más que sanguíneos. De hecho, esta posibilidad de una red de canales de mimetismo vascular linfático había sido previamente propuesta

como una hipótesis dentro del fenómeno del mimetismo vascular (Hendrix *et al.*, 2003a) y podría explicarse como un “intento” de metastatización masiva.

La influencia hormonal en la aparición del proceso de MV en nuestro estudio no queda del todo esclarecida, aunque, en general, todos los casos que mostraron mimetismo vascular presentaron grandes proporciones de RE β , RP y de RA, mientras que fueron negativas o débilmente positivas al RE α . Sin embargo, no parecen existir diferencias en cuanto a la expresión de estos factores en los casos que desarrollan MV y en los que no. Este resultado es similar a lo observado en los tumores mamarios de la mujer, en un estudio en el que se determinó qué receptores hormonales aparecían en casos de tumores mamarios donde se encontraba el fenómeno de MV. En este estudio observaron que no existía diferencia significativa en cuanto a la positividad a los RE y RP entre el grupo de tumores con MV y el grupo de tumores sin MV (Shirakawa *et al.*, 2002d).

Las investigaciones en el CI mamario de la mujer están limitadas por la baja prevalencia de la enfermedad y por el tipo de tratamiento de estas neoplasias (quimioterapia y radioterapia previos a la cirugía); por ello, el uso de modelos animales está muy justificado para este tipo de cáncer mamario. En los CI caninos, debido al rápido desarrollo de la enfermedad y al mal pronóstico, la mayoría de animales son tratados únicamente con terapia paliativa y no reciben quimioterapia ni radioterapia (Pérez-Alenza *et al.*, 2001). El cáncer inflamatorio canino de aparición espontánea ha sido previamente propuesto como modelo natural para el CI mamario humano (Pérez-Alenza *et al.*, 2001; Peña *et al.*, 2003a). Teniendo en cuenta que la frecuencia de aparición de MV en los CI caninos es relativamente elevada, podría resultar muy útil el estudio de este fenómeno de vascularización en el CI canino para determinar los mecanismos que están implicados en este fenómeno e investigar nuevas terapias de tratamiento.

El CI mamario se caracteriza por su elevada capacidad angiogénica y angioinvasiva, de presentación rápida y con un potencial metastásico elevado (Tavassoli, 1999; Pérez-Alenza *et al.*, 2001; Kleer *et al.*, 2002; Giordano, 2003a; Peña *et al.*, 2003b; Mason y Johnson, 2008). En los últimos años ha aumentado el conocimiento acerca del CI mamario en la perra y en la mujer, sin embargo, prácticamente se desconoce el **patrón de metástasis** que se produce en éste tipo especial de cáncer y las diferencias que pueden existir entre éste y el de otros tipos de cánceres mamarios malignos metastásicos no inflamatorios (TMM no-CI).

La principal causa de muerte por cáncer mamario se debe a la diseminación del tumor primario que da lugar a las metástasis (Donegan, 1997). Desde hace mucho tiempo se sabe que el cáncer mamario puede metastatizar a todos los órganos, siendo casi imposible predecir el órgano o sistema que va a ser invadido (Lee, 1983). Sin embargo, nosotros planteamos la hipótesis de que sería posible que determinados tumores, como el CI, tuvieran una mayor predisposición a metastatizar a determinados órganos que otros tipos tumorales no inflamatorios, por ello comparamos el patrón de metástasis de 39 CI mamarios caninos con respecto al de 33 TMM caninos metastásicos no-CI.

Los resultados que hemos obtenido confirman la hipótesis de la que partíamos, puesto que los órganos a los que metastatizan los TMM no-CI difieren significativamente de aquellos donde lo hacen los CI. Además de confirmar las diferencias observadas previamente por nuestro grupo en cuanto a lesiones macroscópicas de necropsias entre casos de CI y TMM no-CI (Pérez-Alenza *et al.*, 2001), por primera vez se descubre que existe un patrón diferencial de metástasis entre CI y TMM no-CI, puesto que los TMM no-CI tienen una frecuencia significativamente mayor a metastatizar a los pulmones, hígado, riñones y hueso que los casos de CI mientras que los CI mamarios producen metástasis a vejiga de la orina y a órganos reproductores, a diferencia de los TMM no-CI que en ningún caso metastatizan a estos órganos. Existieron diferencias entre las metástasis desarrolladas por CI y TMM no-CI a los órganos reproductores aunque no alcanzaron la significación estadística establecida. Consideramos importante destacar este hecho, porque ningún caso de TMM no-CI metastatizó a ovario, útero o vagina y sin embargo el 10,5% de los casos de CI lo hicieron.

Los resultados obtenidos en el grupo TMM no-CI fueron similares a los que han sido descritos para los tumores mamarios no CI de la mujer (Dobson y Lascelles, 2003; Withrow y Vail, 2007), puesto que encontramos que los principales sitios de metástasis fueron ganglios regionales, pulmones, hígado y hueso. Sin embargo, es la primera vez que se describe en la especie canina que estos tumores también producen metástasis a otros órganos como al bazo (12%), al cerebro y músculo (9%, respectivamente) y páncreas (3%) y que no metastatizan a vejiga de la orina y al aparato reproductor.

Por otro lado, nuestro grupo investigador había descrito previamente algunos de los lugares donde metastatizan los CI (Pérez-Alenza *et al.*, 2001), pero el presente estudio aporta una información más completa y amplia acerca del patrón de metástasis de este tipo

tumoral. No sólo se han observado metástasis a ganglios, pulmón, vejiga de la orina, aparato reproductor y corazón, como se describieron previamente (Pérez-Alenza *et al.*, 2001), sino que también se ha observado que un menor porcentaje de metástasis se producen en bazo, glándula adrenal, hígado y riñones (2,6% en cada uno de ellos) y que no suelen metastatizar en el páncreas, músculo, cerebro y hueso. Además, mediante el estudio histopatológico se observó que las metástasis producidas en vejiga de la orina y aparato reproductor no se debieron a una infiltración local del tumor, puesto que se observaron émbolos tumorales en el interior de los vasos del tejido afectado y las serosas se encontraron libres de nódulos e infiltración tumoral directa.

Las diferencias en el patrón de metástasis existentes entre los CI en comparación con los TMM no-CI mamarios caninos podrían estar relacionadas con los mecanismos patogénicos diferentes que se producen en este tipo especial de cáncer, especialmente debido a su capacidad de invasión, angiogénesis, linfangiogénesis y la posibilidad de crear canales de mimetismo vascular.

La elevada proporción de metástasis en la vejiga de la orina y el aparato reproductor encontrada en los CI caninos podría relacionarse con la capacidad invasiva y angiogénica del CI mamario canino, en combinación con los mecanismos endocrinos especiales descritos previamente para este tipo de neoplasia (Nieto *et al.*, 2000; Peña *et al.*, 2003a; Illera *et al.*, 2006; Sanchez-Archidona *et al.*, 2007).

El hecho de determinar cuál es el patrón de metástasis que se produce en los tumores caninos CI y TMM no-CI puede tener importancia desde el punto de vista clínico. Frecuentemente se tiende a buscar metástasis en ganglios regionales y a distancia en los pulmones mediante la realización de radiografías torácicas; sin embargo, consideramos necesario realizar un estudio de la cavidad abdominal mediante ecografía, ya que un gran número de metástasis pueden ser encontradas en órganos abdominales. Si en un futuro se instauran tratamientos específicos en los casos de CI canino, sería de gran importancia descubrir las metástasis precozmente.

Por último, la descripción de los patrones de metástasis en los tumores mamarios caninos, y fundamentalmente en los casos de CI, podría ser de gran ayuda en el estudio del cáncer mamario humano. Como ya se comentó previamente, se han encontrado bastantes similitudes entre el cáncer inflamatorio humano y canino con respecto a la histopatología, características clínicas, prevalencia, etc. Además, la mayor proporción de necropsias que se realizan en la especie canina nos ofrece la posibilidad de estudiar en más ocasiones animales con estadios avanzados y metastásicos del CI. De hecho, no existen datos publicados con respecto a las alteraciones y metástasis observadas durante la autopsia realizada a mujeres con cáncer inflamatorio mamario.

Si tenemos en cuenta los resultados que hemos obtenido con respecto al patrón de metástasis de los TMM no-CI, y los comparamos con los datos publicados acerca de las metástasis que se producen en los casos de TMM no-CI humanos (Abrams *et al.*, 1950; Meissner y Warren, 1971; Sproul cited by Haagensen, 1971; Viadana *et al.*, 1973; Cifuentes y Pickren, 1979; Cho y Choi, 1980; Hagemeister *et al.*, 1980; Amer, 1982; Parham y Robertson, 1989; Mochizuki *et al.*, 1997), se puede comprobar como los cuatro primeros lugares de metástasis encontrados para ambas especies coinciden, siendo éstos ganglios, pulmón y pleura, hueso e hígado, a pesar de que las metástasis al hueso son mucho menos frecuentes en la especie canina que en la mujer.

Las semejanzas entre los patrones de metástasis de las neoplasias TMM no-CI caninos y humano, y la similitud existente entre el CI canino y humano, inducen a pensar que el patrón de metástasis observado en los casos de CI canino, podría coincidir o asimilarse al que se produce en la mujer. Sería interesante evaluar si en el CI de la especie humana existen también metástasis en localizaciones que no se evalúan de forma habitual, como se hace con ganglios regionales y/o pulmón, como podrían ser la vejiga de la orina o el aparato reproductor. Recordemos que conocer la presencia o ausencia de metástasis es de gran importancia para establecer el pronóstico y el tratamiento adecuado.

Para finalizar, nos gustaría destacar un hecho que no se ve reflejado en nuestros resultados, pero que pudimos observar a lo largo de la realización de nuestro estudio y que consiste en que la cantidad de perros con tumores mamarios malignos metastático de GHM III es muy inferior a la que esperábamos. Nos ha sorprendido que un elevado porcentaje de tumores mamarios caninos (metastáticos y GHM III) se corresponden con cánceres inflamatorios, que generalmente se considera un tumor raro. Ésto podría deberse a que

durante los últimos años el HCV de la Facultad de Veterinaria de la UCM ha sido considerado un centro de referencia para este tipo de tumores mamarios caninos.

Este trabajo de Tesis Doctoral presenta el primer estudio en el que exclusivamente se han incluido tumores mamarios caninos malignos metastáticos de GHM III. Consideramos que el número de muestra empleada ha sido suficiente para llevar a cabo los objetivos propuestos inicialmente. Los hallazgos presentados en este trabajo abren nuevas incógnitas y proponen nuevas vías de investigación necesarias para continuar con el estudio del cáncer mamario inflamatorio, con la esperanza de que sirvan de ayuda para el futuro tratamiento de este tipo de cáncer en la mujer y en la perra.

VI CONCLUSIONES

VI. CONCLUSIONES

1. El estudio histopatológico e inmunohistoquímico de los carcinomas inflamatorios (CI) mamarios caninos incluidos en este trabajo demuestra que la mayoría son de origen epitelial, aunque es posible un origen mesenquimatoso. Por ello, el término de carcinoma inflamatorio mamario canino utilizado hasta ahora, debe ser reemplazado por el de ***cáncer mamario inflamatorio canino***, al igual que en medicina humana.
2. Las células tumorales del cáncer mamario inflamatorio (CMI) canino co-expresan citoqueratina y vimentina con mayor frecuencia que las del cáncer mamario no inflamatorio metastático, lo que indica una mayor indiferenciación y agresividad tumoral en el CMI.
3. La presencia de miofibroblastos es más frecuente en el cáncer mamario inflamatorio canino que en el cáncer mamario no inflamatorio metastático, lo que podría estar relacionado con mecanismos especiales de infiltración e invasión tumoral.
4. La inmunoexpresión de los receptores de hormonas esteroideas RE α , RP y RA es similar en el CMI canino y en el cáncer mamario no inflamatorio metastático, aunque la inmunoexpresión del RE β fue significativamente mayor en el CMI que en los no inflamatorios. Las asociaciones encontradas entre RE β , RP y RA y diversos factores de angiogénesis, incluido COX-2, indican que las hormonas esteroideas podrían actuar en el proceso de angiogénesis y linfangiogénesis, especialmente en el CMI.
5. El cáncer mamario inflamatorio canino presenta una mayor densidad de microvascularización y linfangiogénesis que el cáncer mamario no inflamatorio metastático, así como una mayor expresión de los factores angiogénicos VEGF-A, VEGF-D y COX-2.
6. En el cáncer mamario inflamatorio canino, la expresión de COX-2 se asocia con VEGF-D, mientras que en el cáncer mamario no inflamatorio metastático COX-2 se asocia con VEGF-A. Los mecanismos de angiogénesis y linfangiogénesis son diferentes en ambos grupos de tumores.

7. Por primera vez se describe en un proceso neoplásico espontáneo animal, la presencia de células tumorales de elevada malignidad histológica, semejantes a células endoteliales, que forman canales morfológicamente similares a capilares linfáticos y que se corresponden con el fenómeno conocido como mimetismo vascular. El mimetismo vascular es mucho más frecuente, aunque no exclusivo, en el cáncer mamario inflamatorio canino y podría representar una ruta alternativa de metástasis tumoral.
8. La diferente inmunoexpresión en el cáncer mamario inflamatorio canino de los factores angiogénicos estudiados (VEGF-A, VEGF-D y COX-2) junto con la presencia del mimetismo vascular, sugieren que dichos factores, especialmente COX-2, podrían participar en la formación del mimetismo vascular.
9. El cáncer mamario inflamatorio canino presenta un patrón de metástasis a distancia en necropsia diferente al del cáncer mamario no inflamatorio metastático. Las metástasis en la vejiga de la orina y en el aparato reproductor sólo se observaron en casos de CMI. El CMI metastatiza con menor frecuencia a pulmón, hígado, riñón que el cáncer mamario no inflamatorio metastático y en ningún caso lo hace al hueso.

VII BIBLIOGRAFÍA

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Abrams, H.L., Spiro, R., Goldstein, N., 1950, Metastases in carcinoma; analysis of 1000 autopsied cases. *Cancer* 3, 74-85.
- Achen, M.G., Jeltsch, M., Kukk, E., Makinen, T., Vitali, A., Wilks, A.F., Alitalo, K., Stacker, S.A., 1998, Vascular endothelial growth factor D (VEGF-D) is a ligand for the tyrosine kinases VEGF receptor 2 (Flk1) and VEGF receptor 3 (Flt4). *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 548-553.
- Agrawal, B.L., Nath, A.R., Glynn, T.P., Jr., Velazco, D., Garnett, R.F., Jr., 2003, Unusual problems in breast cancer and a rare lung cancer case. Case 3. Simultaneous and synchronous bilateral inflammatory breast cancer. *J Clin Oncol* 21, 2218-2220.
- Agarwal, B., Saxena, R., Morimiya, A., Mehrotra, S., Badve, S., 2005, Lymphangiogenesis does not occur in breast cancer. *Am J Surg Pathol* 29, 1449-1455.
- Agrawal, A.K., Jelen, M., Grzebieniak, Z., Zukrowski, P., Rudnicki, J., Nienartowicz, E., 2008, Androgen receptors as a prognostic and predictive factor in breast cancer. *Folia Histochem Cytobiol* 46, 269-276.
- Ahlgren, J., Risberg, B., Villman, K., Bergh, J., 2002, Angiogenesis in invasive breast carcinoma: a prospective study of tumour heterogeneity. *Eur J Cancer* 38, 64-69.
- Akagi, K., Ikeda, Y., Miyazaki, M., Abe, T., Kinoshita, J., Maehara, Y., Sugimachi, K., 2000, Vascular endothelial growth factor-C (VEGF-C) expression in human colorectal cancer tissues. *Br J Cancer* 83, 887-891.
- Alitalo, K., Carmeliet, P., 2002, Molecular mechanisms of lymphangiogenesis in health and disease. *Cancer Cell* 1, 219-227.
- Alpaugh, M.L., Tomlinson, J.S., Shao, Z.M., Barsky, S.H., 1999, A novel human xenograft model of inflammatory breast cancer. *Cancer Res* 59, 5079-5084.
- Amer, M.H., 1982, Chemotherapy and pattern of metastases in breast cancer patients. *J Surg Oncol* 19, 101-105.
- Anderson, W.F., Chu, K.C., Chang, S., 2003, Inflammatory breast carcinoma and noninflammatory locally advanced breast carcinoma: distinct clinicopathologic entities? *J Clin Oncol* 21, 2254-2259.
- Anderson, W.F., Schairer, C., Chen, B.E., Hance, K.W., Levine, P.H., 2005, Epidemiology of inflammatory breast cancer (IBC). *Breast Dis* 22, 9-23.
- Aoki, Y., Tosato, G., 2005, Lymphatic regeneration: new insights from VEGFR-3 blockade. *J Natl Cancer Inst* 97, 2-3.
- Arun, B., Goss, P., 2004, The role of COX-2 inhibition in breast cancer treatment and prevention. *Semin Oncol* 31, 22-29.
- Asahara, T., Murohara, T., Sullivan, A., Silver, M., van der Zee, R., Li, T., Witzenbichler, B., Schatteman, G., Isner, J.M., 1997, Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 275, 964-967.
- Axelsson, K., Ljung, B.M., Moore, D.H., 2nd, Thor, A.D., Chew, K.L., Edgerton, S.M., Smith, H.S., Mayall, B.H., 1995, Tumor angiogenesis as a prognostic assay for invasive ductal breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 87, 997-1008.

- Aziz, S.A., Pervez, S., Khan, S., Kayani, N., Azam, S.I., Rahbar, M.H., 2001, Case control study of prognostic markers and disease outcome in inflammatory carcinoma breast: a unique clinical experience. *Breast J* 7, 398-404.
- Azumi, N., Battifora, H., 1987, The distribution of vimentin and keratin in epithelial and nonepithelial neoplasms. A comprehensive immunohistochemical study on formalin- and alcohol-fixed tumors. *Am J Clin Pathol* 88, 286-296.
- Baldwin, M.E., Stacker, S.A., Achen, M.G., 2002, Molecular control of lymphangiogenesis. *Bioessays* 24, 1030-1040.
- Bando, H., Weich, H.A., Horiguchi, S., Funata, N., Ogawa, T., Toi, M., 2006, The association between vascular endothelial growth factor-C, its corresponding receptor, VEGFR-3, and prognosis in primary breast cancer: a study with 193 cases. *Oncol Rep* 15, 653-659.
- Banerji, S., Ni, J., Wang, S.X., Clasper, S., Su, J., Tammi, R., Jones, M., Jackson, D.G., 1999, LYVE-1, a new homologue of the CD44 glycoprotein, is a lymph-specific receptor for hyaluronan. *J Cell Biol* 144, 789-801.
- Barber, K.W., Jr., Dockerty, M.B., Clagett, O.T., 1961, Inflammatory carcinoma of the breast. *Surg Gynecol Obstet* 112, 406-410.
- Barista, I., Baltali, E., Gullu, I.H., Guler, N., Celik, I., Saracbası, O., Tekuzman, G., Kars, A., Ozisik, Y., Ruacan, S., Atahan, I.L., Firat, D., 1996, Factors influencing the distribution of metastases and survival in metastatic breast carcinoma. *Am J Clin Oncol* 19, 569-573.
- Barker, J.L., Montague, E.D., Peters, L.J., 1980, Clinical experience with irradiation of inflammatory carcinoma of the breast with and without elective chemotherapy. *Cancer* 45, 625-629.
- Basu, G.D., Pathangey, L.B., Tinder, T.L., Gendler, S.J., Mukherjee, P., 2005, Mechanisms underlying the growth inhibitory effects of the cyclo-oxygenase-2 inhibitor celecoxib in human breast cancer cells. *Breast Cancer Res* 7, R422-435.
- Basu, G.D., Liang, W.S., Stephan, D.A., Wegener, L.T., Conley, C.R., Pockaj, B.A., Mukherjee, P., 2006, A novel role for cyclooxygenase-2 in regulating vascular channel formation by human breast cancer cells. *Breast Cancer Res* 8, R69.
- Bauer, R.L., Busch, E., Levine, E., al., E., 2005, Therapy for inflammatory breast cancer: impact of doxorubicin-based therapy. *Ann Surg Oncol* 2, 288-294.
- Bedwinek, J., Rao, D.V., Perez, C., Lee, J., Fineberg, B., 1982, Stage III and localized stage IV breast cancer: irradiation alone vs irradiation plus surgery. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 8, 31-36.
- Bell, C.A., 1814, *System of Operative Surgery*, Vol 11. Hartford: Hale and Hosmer, 136 p.
- Bennett, A., Charlier, E.M., McDonald, A.M., Simpson, J.S., Stamford, I.F., Zebro, T., 1977, Prostaglandins and breast cancer. *Lancet* 2, 624-626.
- Berger, S.M., 1962, Inflammatory carcinoma of the breast. *Am J Roentgenol Radium Ther Nucl Med* 88, 1109-1116.
- Bhati, R., Patterson, C., Livasy, C.A., Fan, C., Ketelsen, D., Hu, Z., Reynolds, E., Tanner, C., Moore, D.T., Gabrielli, F., Perou, C.M., Klauber-DeMore, N., 2008, Molecular characterization of human breast tumor vascular cells. *Am J Pathol* 172, 1381-1390.
- Bieche, I., Lerebours, F., Tozlu, S., Espie, M., Marty, M., Lidereau, R., 2004, Molecular profiling of inflammatory breast cancer: identification of a poor-prognosis gene expression signature. *Clin Cancer Res* 10, 6789-6795.

- Bland, K.I., Copeland, E.M., 1991, *The breast: comprehensive management of benign and malignant diseases*, 3th Edition Philadelphia.
- Blankenstein, M.A., Maitimu-Smeele, I., Donker, G.H., Daroszewski, J., Milewicz, A., Thijssen, J.H., 1992, Tissue androgens and the endocrine autonomy of breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* 43, 167-171.
- Blankenstein, M.A., van de Ven, J., Maitimu-Smeele, I., Donker, G.H., de Jong, P.C., Daroszewski, J., Szymczak, J., Milewicz, A., Thijssen, J.H., 1999, Intratumoral levels of estrogens in breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* 69, 293-297.
- Blumenschein, G., Montague, E.D., Eckles, N.E., al., E., 1976, Sequential combined modality therapy for inflammatory breast cancer. *Breast Cancer* 2, 16-20.
- Bonnier, P., Charpin, C., Lejeune, C., Romain, S., Tubiana, N., Beedassy, B., Martin, P.M., Serment, H., Piana, L., 1995, Inflammatory carcinomas of the breast: a clinical, pathological, or a clinical and pathological definition? *Int J Cancer* 62, 382-385.
- Bono, P., Wasenius, V.M., Heikkilä, P., Lundin, J., Jackson, D.G., Joensuu, H., 2004, High LYVE-1-positive lymphatic vessel numbers are associated with poor outcome in breast cancer. *Clin Cancer Res* 10, 7144-7149.
- Bosari, S., Lee, A.K., DeLellis, R.A., Wiley, B.D., Heatley, G.J., Silverman, M.L., 1992, Microvessel quantitation and prognosis in invasive breast carcinoma. *Hum Pathol* 23, 755-761.
- Bozzetti, F., Saccozzi, R., De Lena, M., Salvadori, B., 1981, Inflammatory cancer of the breast: analysis of 114 cases. *J Surg Oncol* 18, 355-361.
- Breiteneder-Geleff, S., Soleiman, A., Kowalski, H., Horvat, R., Amann, G., Kriehuber, E., Diem, K., Weninger, W., Tschachler, E., Alitalo, K., Kerjaschki, D., 1999, Angiosarcomas express mixed endothelial phenotypes of blood and lymphatic capillaries: podoplanin as a specific marker for lymphatic endothelium. *Am J Pathol* 154, 385-394.
- Brodey, R.S., Goldschmidt, M.H., Roszel, J.R., 1983, Canine mammary gland neoplasms. *J Am Anim Hosp Assoc* 19, 61-90.
- Brooks, H.L., Mandava, N., Pizzi, W.F., Shah, S., 1998, Inflammatory breast carcinoma: a community hospital experience. *J Am Coll Surg* 186, 622-629.
- Brown, L.F., Guidi, A.J., Schnitt, S.J., Van De Water, L., Iruela-Arispe, M.L., Yeo, T.K., Tognazzi, K., Dvorak, H.F., 1999, Vascular stroma formation in carcinoma in situ, invasive carcinoma, and metastatic carcinoma of the breast. *Clin Cancer Res* 5, 1041-1056.
- Brueggemeier, R.W., Quinn, A.L., Parrett, M.L., Joarder, F.S., Harris, R.E., Robertson, F.M., 1999, Correlation of aromatase and cyclooxygenase gene expression in human breast cancer specimens. *Cancer Lett* 140, 27-35.
- Brunelle, M., Sartin, E.A., Wolfe, L.G., Sirois, J., Dore, M., 2006, Cyclooxygenase-2 expression in normal and neoplastic canine mammary cell lines. *Vet Pathol* 43, 656-666.
- Buijs, J.T., Cleton, A.M., Smit, V.T., Lowik, C.W., S, E.P., Pluijm, G., 2004, Prognostic significance of periodic acid-Schiff-positive patterns in primary breast cancer and its lymph node metastases. *Breast Cancer Res Treat* 84, 117-130.
- Burri, P.H., Hlushchuk, R., Djonov, V., 2004, Intussusceptive angiogenesis: its emergence, its characteristics, and its significance. *Dev Dyn* 231, 474-488.
- Buteau-Lozano, H., Ancelin, M., Lardeux, B., Milanini, J., Perrot-Applanat, M., 2002, Transcriptional regulation of vascular endothelial growth factor by estradiol and tamoxifen in breast cancer cells: a complex interplay between estrogen receptors alpha and beta. *Cancer Res* 62, 4977-4984.

- Cardona, A., Madewell, B.R., Naydan, D.K., Lund, J.K., 1989, A comparison of six monoclonal antibodies for detection of cytokeratins in normal and neoplastic canine tissues. *J Vet Diagn Invest* 1, 316-323.
- Cariati, M., Bennett-Britton, T.M., Pinder, S.E., Purushotham, A.D., 2005, "Inflammatory" breast cancer. *Surg Oncol* 14, 133-143.
- Carmeliet, P., Jain, R.K., 2000, Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 407, 249-257.
- Carmeliet, P., 2005, Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature* 438, 932-936.
- Carter, C.L., Allen, C., Henson, D.E., 1989, Relation of tumor size, lymph node status, and survival in 24,740 breast cancer cases. *Cancer* 63, 181-187.
- Chang, S., Parker, S.L., Pham, T., Buzdar, A.U., Hursting, S.D., 1998a, Inflammatory breast carcinoma incidence and survival: the surveillance, epidemiology, and end results program of the National Cancer Institute, 1975-1992. *Cancer* 82, 2366-2372.
- Chang, S., Buzdar, A.U., Hursting, S.D., 1998b, Inflammatory breast cancer and body mass index. *J Clin Oncol* 16, 3731-3735.
- Chang, S., Alderfer, J.R., Asmar, L., Buzdar, A.U., 2000, Inflammatory breast cancer survival: the role of obesity and menopausal status at diagnosis. *Breast Cancer Res Treat* 64, 157-163.
- Chaponnier, C., Gabbiani, G., 2004, Pathological situations characterized by altered actin isoform expression. *J Pathol* 204, 386-395.
- Charafe-Jauffret, E., Tarpin, C., Bardou, V.J., Bertucci, F., Ginestier, C., Braud, A.C., Puig, B., Geneix, J., Hassoun, J., Birnbaum, D., Jacquemier, J., Viens, P., 2004, Immunophenotypic analysis of inflammatory breast cancers: identification of an 'inflammatory signature'. *J Pathol* 202, 265-273.
- Charafe-Jauffret, E., Tarpin, C., Patrice, V., Bertucci, F., 2008, Defining the molecular biology of inflammatory breast cancer. *Semin Oncol* 35, 41-50.
- Charpin, C., Bonnier, P., Khouzami, A., Vacheret, H., Andrac, L., Lavaut, M.N., Allasia, C., Piana, L., 1992, Inflammatory breast carcinoma: an immunohistochemical study using monoclonal anti-pHER-2/neu, pS2, cathepsin, ER and PR. *Anticancer Res* 12, 591-597.
- Charpin, C., Dales, J.P., Garcia, S., Carpentier, S., Djemli, A., Andrac, L., Lavaut, M.N., Allasia, C., Bonnier, P., 2004, Tumor neoangiogenesis by CD31 and CD105 expression evaluation in breast carcinoma tissue microarrays. *Clin Cancer Res* 10, 5815-5819.
- Chen, M.H., Yip, G.W., Tse, G.M., Moriya, T., Lui, P.C., Zin, M.L., Bay, B.H., Tan, P.H., 2008, Expression of basal keratins and vimentin in breast cancers of young women correlates with adverse pathologic parameters. *Mod Pathol* 21, 1183-1191.
- Chen, W.Y., Hankinson, S.E., Schnitt, S.J., Rosner, B.A., Holmes, M.D., Colditz, G.A., 2004, Association of hormone replacement therapy to estrogen and progesterone receptor status in invasive breast carcinoma. *Cancer* 101, 1490-1500.
- Chevallier, B., Asselain, B., Kunlin, A., Veyret, C., Bastit, P., Graic, Y., 1987, Inflammatory breast cancer. Determination of prognostic factors by univariate and multivariate analysis. *Cancer* 60, 897-902.
- Chevallier, B., Bastit, P., Graic, Y., Menard, J.F., Dauce, J.P., Julien, J.P., Clavier, B., Kunlin, A., D'Anjou, J., 1993a, The Centre H. Becquerel studies in inflammatory non metastatic breast cancer. Combined modality approach in 178 patients. *Br J Cancer* 67, 594-601.
- Chevallier, B., Roche, H., Olivier, J.P., Chollet, P., Hurteloup, P., 1993b, Inflammatory breast cancer. Pilot study of intensive induction chemotherapy (FEC-HD) results in a high histologic response rate. *Am J Clin Oncol* 16, 223-228.

- Chiedozi, L.C., 1987, Rapidly progressing breast cancer in Nigeria. *Eur J Surg Oncol* 13, 505-509.
- Chiedozi, L.C., 1988, Prognostic significance of exclusive skeletal metastases in stage IV primary carcinoma of the breast. *Surg Gynecol Obstet* 167, 303-306.
- Cho, S.Y., Choi, H.Y., 1980, Causes of death and metastatic patterns in patients with mammary cancer. Ten-year autopsy study. *Am J Clin Pathol* 73, 232-234.
- Choi, W.W., Lewis, M.M., Lawson, D., Yin-Goen, Q., Birdsong, G.G., Cotsonis, G.A., Cohen, C., Young, A.N., 2005, Angiogenic and lymphangiogenic microvessel density in breast carcinoma: correlation with clinicopathologic parameters and VEGF-family gene expression. *Mod Pathol* 18, 143-152.
- Chow, C.K., 2005, Imaging in inflammatory breast carcinoma. *Breast Dis* 22, 45-54.
- Cid, M.C., Schnaper, H.W., Kleinman, H.K., 2002, Estrogens and the vascular endothelium. *Ann N Y Acad Sci* 966, 143-157.
- Cifuentes, N., Pickren, J.W., 1979, Metastases from carcinoma of mammary gland: an autopsy study. *J Surg Oncol* 11, 193-205.
- Clauss, M., Gerlach, M., Gerlach, H., Brett, J., Wang, F., Familletti, P.C., Pan, Y.C., Olander, J.V., Connolly, D.T., Stern, D., 1990, Vascular permeability factor: a tumor-derived polypeptide that induces endothelial cell and monocyte procoagulant activity, and promotes monocyte migration. *J Exp Med* 172, 1535-1545.
- Clemente, M., De Andres, P.J., Peña, L., Pérez Alenza, M.D., 2009, Survival time of dogs with Inflammatory Mammary Cancer treated with chemotherapy and palliative therapy versus palliative therapy alone. *Vet Rec* XXX, XXX.
- Cohen, P.L., Brooks, J.J., 1991, Lymphomas of the breast. A clinicopathologic and immunohistochemical study of primary and secondary cases. *Cancer* 67, 1359-1369.
- Colpaert, C.G., Vermeulen, P.B., Benoy, I., Soubry, A., van Roy, F., van Beest, P., Goovaerts, G., Dirix, L.Y., van Dam, P., Fox, S.B., Harris, A.L., van Marck, E.A., 2003, Inflammatory breast cancer shows angiogenesis with high endothelial proliferation rate and strong E-cadherin expression. *Br J Cancer* 88, 718-725.
- Conde, I., Alfaro, J.M., Fraile, B., Ruiz, A., Paniagua, R., Arenas, M.I., 2004, DAX-1 expression in human breast cancer: comparison with estrogen receptors ER-alpha, ER-beta and androgen receptor status. *Breast Cancer Res* 6, R140-148.
- Conway, E.M., Collen, D., Carmeliet, P., 2001, Molecular mechanisms of blood vessel growth. *Cardiovasc Res* 49, 507-521.
- Cooley, D.M., Waters, D.J., 1998, Skeletal metastasis as the initial clinical manifestation of metastatic carcinoma in 19 dogs. *J Vet Intern Med* 12, 288-293.
- Coomber, B.L., Denton, J., Sylvestre, A., Kruth, S., 1998, Blood vessel density in canine osteosarcoma. *Can J Vet Res* 62, 199-204.
- Costa, C., Soares, R., Reis-Filho, J.S., Leitao, D., Amendoeira, I., Schmitt, F.C., 2002, Cyclo-oxygenase 2 expression is associated with angiogenesis and lymph node metastasis in human breast cancer. *J Clin Pathol* 55, 429-434.
- Costello, P., McCann, A., Carney, D.N., Dervan, P.A., 1995, Prognostic significance of microvessel density in lymph node negative breast carcinoma. *Hum Pathol* 26, 1181-1184.
- Cunnick, G.H., Jiang, W.G., Gomez, K.F., Mansel, R.E., 2002, Lymphangiogenesis and breast cancer metastasis. *Histol Histopathol* 17, 863-870.

- Cunnick, G.H., Jiang, W.G., Douglas-Jones, T., Watkins, G., Gomez, K.F., Morgan, M.J., Subramanian, A., Mokbel, K., Mansel, R.E., 2008, Lymphangiogenesis and lymph node metastasis in breast cancer. *Mol Cancer* 7, 23.
- Curcio, L.D., Rupp, E., Williams, W.L., Chu, D.Z., Clarke, K., Odom-Maryon, T., Ellenhorn, J.D., Somlo, G., Wagman, L.D., 1999, Beyond palliative mastectomy in inflammatory breast cancer--a reassessment of margin status. *Ann Surg Oncol* 6, 249-254.
- Currie, M.J., Hanrahan, V., Gunningham, S.P., Morrin, H.R., Frampton, C., Han, C., Robinson, B.A., Fox, S.B., 2004, Expression of vascular endothelial growth factor D is associated with hypoxia inducible factor (HIF-1alpha) and the HIF-1alpha target gene DEC1, but not lymph node metastasis in primary human breast carcinomas. *J Clin Pathol* 57, 829-834.
- Cursiefen, C., Schlotzer-Schrehardt, U., Kuchle, M., Sorokin, L., Breiteneder-Geleff, S., Alitalo, K., Jackson, D., 2002, Lymphatic vessels in vascularized human corneas: immunohistochemical investigation using LYVE-1 and podoplanin. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43, 2127-2135.
- da Silva, B.B., de Carvalho Goncalves Nunes Galvao, E.R., Dos Santos, L.G., 2006, Evaluation of CD34 antigen expression following tamoxifen as primary treatment for breast cancer. *Int J Gynaecol Obstet* 93, 70-71.
- Dabrosin, C., 2003, Variability of vascular endothelial growth factor in normal human breast tissue in vivo during the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 88, 2695-2698.
- Dahlbeck, S.W., Donnelly, J.F., Theriault, R.L., 1995, Differentiating inflammatory breast cancer from acute mastitis. *Am Fam Physician* 52, 929-934.
- Dales, J.P., Garcia, S., Bonnier, P., Duffaud, F., Carpentier, S., Djemli, A., Ramuz, O., Andrac, L., Lavaut, M., Allasia, C., Charpin, C., 2003, [Prognostic significance of VEGF receptors, VEGFR-1 (Flt-1) and VEGFR-2 (KDR/Flk-1) in breast carcinoma]. *Ann Pathol* 23, 297-305.
- Daniel, T.O., Liu, H., Morrow, J.D., Crews, B.C., Marnett, L.J., 1999, Thromboxane A2 is a mediator of cyclooxygenase-2-dependent endothelial migration and angiogenesis. *Cancer Res* 59, 4574-4577.
- Dawood, S., Broglio, K., Gonzalez-Angulo, A.M., Kau, S.W., Islam, R., Hortobagyi, G.N., Cristofanilli, M., 2008a, Prognostic value of body mass index in locally advanced breast cancer. *Clin Cancer Res* 14, 1718-1725.
- Dawood, S., Ueno, N.T., Cristofanilli, M., 2008b, The medical treatment of inflammatory breast cancer. *Semin Oncol* 35, 64-71.
- De Boer, R.H., Allum, W.H., Ebbs, S.R., Gui, G.P., Johnston, S.R., Sacks, N.P., Walsh, G., Ashley, S., Smith, I.E., 2000, Multimodality therapy in inflammatory breast cancer: is there a place for surgery? *Ann Oncol* 11, 1147-1153.
- de Jong, J.S., van Diest, P.J., van der Valk, P., Baak, J.P., 2001, Expression of growth factors, growth factor receptors and apoptosis related proteins in invasive breast cancer: relation to apoptotic rate. *Breast Cancer Res Treat* 66, 201-208.
- de Las Mulas, J.M., Millan, Y., Dios, R., 2005, A prospective analysis of immunohistochemically determined estrogen receptor alpha and progesterone receptor expression and host and tumor factors as predictors of disease-free period in mammary tumors of the dog. *Vet Pathol* 42, 200-212.
- De Matos, A.J., Lopes, C.C., Faustino, A.M., Carvalheira, J.G., Dos Santos, M.S., Rutteman, G.R., Gartner Mde, F., 2006, MIB-1 labelling indices according to clinico-pathological variables in canine mammary tumours: a multivariate study. *Anticancer Res* 26, 1821-1826.
- Delarue, J.C., May-Levin, F., Mouriesse, H., Contesso, G., Sancho-Garnier, H., 1981, Oestrogen and progesterone cytosolic receptors in clinically inflammatory tumours of the human breast. *Br J Cancer* 44, 911-916.

- Denkert, C., Winzer, K.J., Muller, B.M., Weichert, W., Pest, S., Kobel, M., Kristiansen, G., Reles, A., Siegert, A., Guski, H., Hauptmann, S., 2003, Elevated expression of cyclooxygenase-2 is a negative prognostic factor for disease free survival and overall survival in patients with breast carcinoma. *Cancer* 97, 2978-2987.
- Denkert, C., Winzer, K.J., Hauptmann, S., 2004, Prognostic impact of cyclooxygenase-2 in breast cancer. *Clin Breast Cancer* 4, 428-433.
- Denoix, P., 1970, *Treatnebt of malignant breast tumors*, Vol 31. Springer-Verlag, Berlin.
- Dershaw, D.D., Moore, M.P., Liberman, L., Deutch, B.M., 1994, Inflammatory breast carcinoma: mammographic findings. *Radiology* 190, 831-834.
- Desmouliere, A., Guyot, C., Gabbiani, G., 2004, The stroma reaction myofibroblast: a key player in the control of tumor cell behavior. *Int J Dev Biol* 48, 509-517.
- Destexhe, E., Lespagnard, L., Degeyter, M., Heymann, R., Coignoul, F., 1993, Immunohistochemical identification of myoepithelial, epithelial, and connective tissue cells in canine mammary tumors. *Vet Pathol* 30, 146-154.
- Domagala, W., Lasota, J., Dukowicz, A., Markiewski, M., Striker, G., Weber, K., Osborn, M., 1990a, Vimentin expression appears to be associated with poor prognosis in node-negative ductal NOS breast carcinomas. *Am J Pathol* 137, 1299-1304.
- Domagala, W., Wozniak, L., Lasota, J., Weber, K., Osborn, M., 1990b, Vimentin is preferentially expressed in high-grade ductal and medullary, but not in lobular breast carcinomas. *Am J Pathol* 137, 1059-1064.
- Djonov, V., Andres, A.C., Ziemiecki, A., 2001, Vascular remodeling during the normal and malignant life cycle of the mammary gland. *Microscopy Research and Technique* 52, 182-189.
- Dobson, J.M., Lascelles, B.D.X., 2003, *BSAVA manual of canine and feline oncology*, 2nd ed. / editors, Jane M. Dobson, B. Duncan X. Lascelles. Edition. British Small Animal Veterinary Association, Quedgeley, viii, 344 p. pp.
- Dome, B., Paku, S., Somlai, B., Timar, J., 2002, Vascularization of cutaneous melanoma involves vessel co-option and has clinical significance. *J Pathol* 197, 355-362.
- Dome, B., Hendrix, M.J., Paku, S., Tovari, J., Timar, J., 2007, Alternative vascularization mechanisms in cancer: Pathology and therapeutic implications. *Am J Pathol* 170, 1-15.
- Donegan, W.L., 1967, *Staging and end results*. Saunders, Philadelphia.
- Donegan, W.L., 1997, Tumor-related prognostic factors for breast cancer. *CA Cancer J Clin* 47, 28-51.
- Donnay, I., Rauis, J., Devleeschouwer, N., Wouters-Ballman, P., Leclercq, G., Verstegen, J., 1995, Comparison of estrogen and progesterone receptor expression in normal and tumor mammary tissues from dogs. *Am J Vet Res* 56, 1188-1194.
- Dore, M., Lanthier, I., Sirois, J., 2003, Cyclooxygenase-2 expression in canine mammary tumors. *Vet Pathol* 40, 207-212.
- Droulias, C.A., Sewell, C.W., McSweeney, M.B., Powell, R.W., 1976, Inflammatory carcinoma of the breast: A correlation of clinical, radiologic and pathologic findings. *Ann Surg* 184, 217-222.
- Dubois, R.N., Abramson, S.B., Crofford, L., Gupta, R.A., Simon, L.S., Van De Putte, L.B., Lipsky, P.E., 1998, Cyclooxygenase in biology and disease. *FASEB J* 12, 1063-1073.

- Dvorak, H.F., Sioussat, T.M., Brown, L.F., Berse, B., Nagy, J.A., Sotrel, A., Manseau, E.J., Van de Water, L., Senger, D.R., 1991, Distribution of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) in tumors: concentration in tumor blood vessels. *J Exp Med* 174, 1275-1278.
- Ebata, N., Nodasaka, Y., Sawa, Y., Yamaoka, Y., Makino, S., Totsuka, Y., Yoshida, S., 2001, Desmoplakin as a specific marker of lymphatic vessels. *Microvasc Res* 61, 40-48.
- El-Gohary, Y.M., Metwally, G., Saad, R.S., Robinson, M.J., Mesko, T., Poppiti, R.J., 2008, Prognostic significance of intratumoral and peritumoral lymphatic density and blood vessel density in invasive breast carcinomas. *Am J Clin Pathol* 129, 578-586.
- Elkin, M., Orgel, A., Kleinman, H.K., 2004, An angiogenic switch in breast cancer involves estrogen and soluble vascular endothelial growth factor receptor 1. *J Natl Cancer Inst* 96, 875-878.
- Elston, C.W., Ellis, I.O., 1991, Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology* 19, 403-410.
- Espinosa de los Monteros, A., Millan, M.Y., Ordas, J., Carrasco, L., Reymundo, C., Martin de las Mulas, J., 2002, Localization of the smooth muscle-specific protein calponin in complex and mixed tumors of the mammary gland of the dog: Assessment of the morphogenetic role of the myoepithelium. *Vet Pathol* 39, 247-256.
- Espinosa de los Monteros, A., Hellmen, E., Ramirez, G.A., Herraiez, P., Rodriguez, F., Ordas, J., Millan, Y., Lara, A., Martin de las Mulas, J., 2003, Lipid-rich carcinomas of the mammary gland in seven dogs: clinicopathologic and immunohistochemical features. *Vet Pathol* 40, 718-723.
- Espinosa de los Monteros, A., Millan, M.Y., Ramirez, G.A., Ordas, J., Reymundo, C., Martin de las Mulas, J., 2005, Expression of maspin in mammary gland tumors of the dog. *Vet Pathol* 42, 250-257.
- Evangelou, E., Kyzas, P.A., Trikalinos, T.A., 2005, Comparison of the diagnostic accuracy of lymphatic endothelium markers: Bayesian approach. *Mod Pathol* 18, 1490-1497.
- Ewing, J., 1934, Neoplastic diseases a Treatise on Tumors Philadelphia, 523-583 pp.
- Falette, N., Paperin, M.P., Treilleux, I., Gratadour, A.C., Peloux, N., Mignotte, H., Tooke, N., Lofman, E., Inganas, M., Bremond, A., Ozturk, M., Puisieux, A., 1998, Prognostic value of P53 gene mutations in a large series of node-negative breast cancer patients. *Cancer Res* 58, 1451-1455.
- Favier, J., Plouin, P.F., Corvol, P., Gasc, J.M., 2002, Angiogenesis and vascular architecture in pheochromocytomas: distinctive traits in malignant tumors. *Am J Pathol* 161, 1235-1246.
- Ferrara, N., Bunting, S., 1996, Vascular endothelial growth factor, a specific regulator of angiogenesis. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 5, 35-44.
- Ferrara, N., Davis-Smyth, T., 1997, The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev* 18, 4-25.
- Ferrara, N., 2002, Role of vascular endothelial growth factor in physiologic and pathologic angiogenesis: therapeutic implications. *Semin Oncol* 29, 10-14.
- Ferrara, N., Gerber, H.P., LeCouter, J., 2003, The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 9, 669-676.
- Fina, L., Molgaard, H.V., Robertson, D., Bradley, N.J., Monaghan, P., Delia, D., Sutherland, D.R., Baker, M.A., Greaves, M.F., 1990, Expression of the CD34 gene in vascular endothelial cells. *Blood* 75, 2417-2426.
- Fisher, B., Bauer, M., Wickerham, D.L., Redmond, C.K., Fisher, E.R., Cruz, A.B., Foster, R., Gardner, B., Lerner, H., Margoese, R., et al., 1983, Relation of number of positive axillary nodes to the prognosis of patients with primary breast cancer. An NSABP update. *Cancer* 52, 1551-1557.

- Fleming, R.Y., Asmar, L., Buzdar, A.U., McNeese, M.D., Ames, F.C., Ross, M.I., Singletary, S.E., 1997, Effectiveness of mastectomy by response to induction chemotherapy for control in inflammatory breast carcinoma. *Ann Surg Oncol* 4, 452-461.
- Folberg, R., Hendrix, M.J., Maniotis, A.J., 2000, Vasculogenic mimicry and tumor angiogenesis. *Am J Pathol* 156, 361-381.
- Folberg, R., Maniotis, A.J., 2004, Vasculogenic mimicry. *APMIS* 112, 508-525.
- Folkman, J., 1995a, Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med* 1, 27-31.
- Folkman, J., 1995b, Seminars in Medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. Clinical applications of research on angiogenesis. *N Engl J Med* 333, 1757-1763.
- Folkman, J., 1997, Angiogenesis and angiogenesis inhibition: an overview. *EXS* 79, 1-8.
- Folpe, A.L., Gown, A.M., 2001, Immunohistochemistry for analysis of soft tissue tumors, In: Weiss, S.W., Goldblum, J.R. (Eds.) *Soft Tissue Tumors*. Mosby, Inc., St. Louis, Missouri, pp. 199-245.
- Forozan, F., Veldman, R., Ammerman, C.A., Parsa, N.Z., Kallioniemi, A., Kallioniemi, O.P., Ethier, S.P., 1999, Molecular cytogenetic analysis of 11 new breast cancer cell lines. *Br J Cancer* 81, 1328-1334.
- Fowler, E.H., Wilson, G.P., Koestner, A., 1974, Biologic behavior of canine mammary neoplasms based on a histogenetic classification. *Vet Pathol* 11, 212-229.
- Fox, S.B., Gasparini, G., Harris, A.L., 2001, Angiogenesis: pathological, prognostic, and growth-factor pathways and their link to trial design and anticancer drugs. *Lancet Oncol* 2, 278-289.
- Fox, S.B., 2006, Quantitative angiogenesis in breast cancer. *Methods Mol Med* 120, 161-187.
- Franchi, A., Gallo, O., Massi, D., Baroni, G., Santucci, M., 2004, Tumor lymphangiogenesis in head and neck squamous cell carcinoma: a morphometric study with clinical correlations. *Cancer* 101, 973-978.
- Fuckar, D., Dekanic, A., Stifter, S., Mustac, E., Krstulja, M., Dobrila, F., Jonjic, N., 2006, VEGF expression is associated with negative estrogen receptor status in patients with breast cancer. *Int J Surg Pathol* 14, 49-55.
- Gabbiani, G., Le Lous, M., Bailey, A.J., Bazin, S., Delaunay, A., 1976, Collagen and myofibroblasts of granulation tissue. A chemical, ultrastructural and immunologic study. *Virchows Arch B Cell Pathol* 21, 133-145.
- Gabrilovich, D., Ishida, T., Oyama, T., Ran, S., Kravtsov, V., Nadaf, S., Carbone, D.P., 1998, Vascular endothelial growth factor inhibits the development of dendritic cells and dramatically affects the differentiation of multiple hematopoietic lineages in vivo. *Blood* 92, 4150-4166.
- Garvin, S., Nilsson, U.W., Dabrosin, C., 2005, Effects of oestradiol and tamoxifen on VEGF, soluble VEGFR-1, and VEGFR-2 in breast cancer and endothelial cells. *Br J Cancer* 93, 1005-1010.
- Gasparini, G., Weidner, N., Bevilacqua, P., Maluta, S., Dalla Palma, P., Caffo, O., Barbareschi, M., Boracchi, P., Marubini, E., Pozza, F., 1994, Tumor microvessel density, p53 expression, tumor size, and peritumoral lymphatic vessel invasion are relevant prognostic markers in node-negative breast carcinoma. *J Clin Oncol* 12, 454-466.
- Gasparini, G., Toi, M., Gion, M., Verderio, P., Dittadi, R., Hanatani, M., Matsubara, I., Vinante, O., Bonoldi, E., Boracchi, P., Gatti, C., Suzuki, H., Tominaga, T., 1997, Prognostic significance of vascular endothelial growth factor protein in node-negative breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 89, 139-147.

- Gehling, U.M., Ergun, S., Schumacher, U., Wagener, C., Pantel, K., Otte, M., Schuch, G., Schafhausen, P., Mende, T., Kilic, N., Kluge, K., Schafer, B., Hossfeld, D.K., Fiedler, W., 2000, In vitro differentiation of endothelial cells from AC133-positive progenitor cells. *Blood* 95, 3106-3112.
- Giatromanolaki, A., Koukourakis, M.I., Theodossiou, D., Barbatis, K., O'Byrne, K., Harris, A.L., Gatter, K.C., 1997, Comparative evaluation of angiogenesis assessment with anti-factor-VIII and anti-CD31 immunostaining in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 3, 2485-2492.
- Giordano, S.H., 2003a, Update on locally advanced breast cancer. *Oncologist* 8, 521-530.
- Giordano, S.H., Hortobagyi, G.N., 2003b, Inflammatory breast cancer: clinical progress and the main problems that must be addressed. *Breast Cancer Res* 5, 284-288.
- Gisterek, I., Matkowski, R., Kozlak, J., Dus, D., Lacko, A., Szelachowska, J., Kornafel, J., 2007, Evaluation of prognostic value of VEGF-C and VEGF-D in breast cancer--10 years follow-up analysis. *Anticancer Res* 27, 2797-2802.
- Gong, Y., 2008, Pathologic aspects of inflammatory breast cancer: part 2. Biologic insights into its aggressive phenotype. *Semin Oncol* 35, 33-40.
- Gonzalez, L.O., Corte, M.D., Vazquez, J., Junquera, S., Sanchez, R., Alvarez, A.C., Rodriguez, J.C., Lamelas, M.L., Vizoso, F.J., 2008, Androgen receptor expression in breast cancer: relationship with clinicopathological characteristics of the tumors, prognosis, and expression of metalloproteases and their inhibitors. *BMC Cancer* 8, 149.
- Gonzalez-Angulo, A.M., Sneige, N., Buzdar, A.U., Valero, V., Kau, S.W., Broglio, K., Yamamura, Y., Hortobagyi, G.N., Cristofanilli, M., 2004, p53 expression as a prognostic marker in inflammatory breast cancer. *Clin Cancer Res* 10, 6215-6221.
- Gothert, J.R., Gustin, S.E., van Eekelen, J.A., Schmidt, U., Hall, M.A., Jane, S.M., Green, A.R., Gottgens, B., Izon, D.J., Begley, C.G., 2004, Genetically tagging endothelial cells in vivo: bone marrow-derived cells do not contribute to tumor endothelium. *Blood* 104, 1769-1777.
- Goulding, H., Abdul Rashid, N.F., Robertson, J.F., Bell, J.A., Elston, C.W., Blamey, R.W., Ellis, I.O., 1995, Assessment of angiogenesis in breast carcinoma: an important factor in prognosis? *Hum Pathol* 26, 1196-1200.
- Grace, W.R., Cooperman, A.M., 1985, Inflammatory breast cancer. *Surg Clin North Am* 65, 151-160.
- Graham, J.C., Myers, R.K., 1999, The prognostic significance of angiogenesis in canine mammary tumors. *J Vet Intern Med* 13, 416-418.
- Greene, F.L., Page, D.L., Fleming, I.D., Fritz, A.G., Balch, C.M., Haller, D.G., 2002, *Breast*, 6th Edition. Springer-Verlag, New York.
- Grieco, V., Locatelli, C., Riccardi, E., Brambilla, P., 2008, A case of two different tumors in the heart of a dog. *J Vet Diagn Invest* 20, 365-368.
- Griffey, S.M., Madewell, B.R., Dairkee, S.H., Hunt, J.E., Naydan, D.K., Higgins, R.J., 1993, Immunohistochemical reactivity of basal and luminal epithelium-specific cytokeratin antibodies within normal and neoplastic canine mammary glands. *Vet Pathol* 30, 155-161.
- Griffey, S.M., Verstraete, F.J., Kraegel, S.A., Lucroy, M.D., Madewell, B.R., 1998, Computer-assisted image analysis of intratumoral vessel density in mammary tumors from dogs. *Am J Vet Res* 59, 1238-1242.
- Guerin, M., Gabillot, M., Mathieu, M.C., Travagli, J.P., Spielmann, M., Andrieu, N., Riou, G., 1989, Structure and expression of c-erbB-2 and EGF receptor genes in inflammatory and non-inflammatory breast cancer: prognostic significance. *Int J Cancer* 43, 201-208.

- Gunhan-Bilgen, I., Ustun, E.E., Memis, A., 2002, Inflammatory breast carcinoma: mammographic, ultrasonographic, clinical, and pathologic findings in 142 cases. *Radiology* 223, 829-838.
- Gunningham, S.P., Currie, M.J., Han, C., Robinson, B.A., Scott, P.A., Harris, A.L., Fox, S.B., 2000, The short form of the alternatively spliced flt-4 but not its ligand vascular endothelial growth factor C is related to lymph node metastasis in human breast cancers. *Clin Cancer Res* 6, 4278-4286.
- Gunningham, S.P., Currie, M.J., Han, C., Robinson, B.A., Scott, P.A., Harris, A.L., Fox, S.B., 2001, VEGF-B expression in human primary breast cancers is associated with lymph node metastasis but not angiogenesis. *J Pathol* 193, 325-332.
- Guzman, G., Cotler, S.J., Lin, A.Y., Maniotis, A.J., Folberg, R., 2007, A pilot study of vasculogenic mimicry immunohistochemical expression in hepatocellular carcinoma. *Arch Pathol Lab Med* 131, 1776-1781.
- Haagensen, C.D., 1956, *Inflammatory Carcinoma*. Saunders, Philadelphia.
- Haagensen, C.D., 1971, *Diseases of the breast*, 2nd Edition. Saunders, Philadelphia.
- Hagemeister, F.B., Jr., Buzdar, A.U., Luna, M.A., Blumenschein, G.R., 1980, Causes of death in breast cancer: a clinicopathologic study. *Cancer* 46, 162-167.
- Hahnel, R., Twaddle, E., 1971, Estrogen receptors in human breast cancer. 1. Methodology and characterization of receptors. *Steroids* 18, 653-680.
- Half, E., Tang, X.M., Gwyn, K., Sahin, A., Wathen, K., Sinicrope, F.A., 2002, Cyclooxygenase-2 expression in human breast cancers and adjacent ductal carcinoma in situ. *Cancer Res* 62, 1676-1681.
- Hall, N.R., Fish, D.E., Hunt, N., Goldin, R.D., Guillou, P.J., Monson, J.R., 1992, Is the relationship between angiogenesis and metastasis in breast cancer real? *Surg Oncol* 1, 223-229.
- Hampe, J.F., Misdorp, W., 1974, Tumours and dysplasias of the mammary gland. *Bull World Health Organ* 50, 111-133.
- Han, H., Silverman, J.F., Santucci, T.S., Macherey, R.S., d'Amato, T.A., Tung, M.Y., Weyant, R.J., Landreneau, R.J., 2001, Vascular endothelial growth factor expression in stage I non-small cell lung cancer correlates with neoangiogenesis and a poor prognosis. *Ann Surg Oncol* 8, 72-79.
- Hanahan, D., Folkman, J., 1996, Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 86, 353-364.
- Hanahan, D., Weinberg, R.A., 2000, The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70.
- Hance, K.W., Anderson, W.F., Devesa, S.S., Young, H.A., Levine, P.H., 2005, Trends in inflammatory breast carcinoma incidence and survival: the surveillance, epidemiology, and end results program at the National Cancer Institute. *J Natl Cancer Inst* 97, 966-975.
- Hansen, S., Grabau, D.A., Sorensen, F.B., Bak, M., Vach, W., Rose, C., 2000, The prognostic value of angiogenesis by Chalkley counting in a confirmatory study design on 836 breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 6, 139-146.
- Hansen, S., Sorensen, F.B., Vach, W., Grabau, D.A., Bak, M., Rose, C., 2004, Microvessel density compared with the Chalkley count in a prognostic study of angiogenesis in breast cancer patients. *Histopathology* 44, 428-436.
- Hao, X., Sun, B., Zhang, S., Zhao, X., 2002, [Microarray study of vasculogenic mimicry in bi-directional differentiation malignant tumor]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 82, 1298-1302.
- Hao, X.S., Sun, B.C., Zhang, S.W., Zhao, X.L., 2003, [Correlation between the expression of collagen IV, VEGF and vasculogenic mimicry]. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi* 25, 524-526.

- Harris, E.E., Schultz, D., Bertsch, H., Fox, K., Glick, J., Solin, L.J., 2003, Ten-year outcome after combined modality therapy for inflammatory breast cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 55, 1200-1208.
- Hattori, K., Dias, S., Heissig, B., Hackett, N.R., Lyden, D., Tatenos, M., Hicklin, D.J., Zhu, Z., Witte, L., Crystal, R.G., Moore, M.A., Rafii, S., 2001, Vascular endothelial growth factor and angiopoietin-1 stimulate postnatal hematopoiesis by recruitment of vasculogenic and hematopoietic stem cells. *J Exp Med* 193, 1005-1014.
- Healy, L., May, G., Gale, K., Grosveld, F., Greaves, M., Enver, T., 1995, The stem cell antigen CD34 functions as a regulator of hemopoietic cell adhesion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 12240-12244.
- Heissig, B., Hattori, K., Dias, S., Friedrich, M., Ferris, B., Hackett, N.R., Crystal, R.G., Besmer, P., Lyden, D., Moore, M.A., Werb, Z., Rafii, S., 2002, Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of kit-ligand. *Cell* 109, 625-637.
- Heller, D.A., Clifford, C.A., Goldschmidt, M.H., Holt, D.E., Shofer, F.S., Smith, A., Sorensen, K.U., 2005, Cyclooxygenase-2 expression is associated with histologic tumor type in canine mammary carcinoma. *Vet Pathol* 42, 776-780.
- Hellmen, E., Lindgren, A., 1989, The expression of intermediate filaments in canine mammary glands and their tumors. *Vet Pathol* 26, 420-428.
- Hellmen, E., Bergstrom, R., Holmberg, L., Spangberg, I.B., Hansson, K., Lindgren, A., 1993, Prognostic factors in canine mammary tumors: a multivariate study of 202 consecutive cases. *Vet Pathol* 30, 20-27.
- Hendrix, M.J., Seftor, E.A., Chu, Y.W., Seftor, R.E., Nagle, R.B., McDaniel, K.M., Leong, S.P., Yohem, K.H., Leibovitz, A.M., Meyskens, F.L., Jr., et al., 1992, Coexpression of vimentin and keratins by human melanoma tumor cells: correlation with invasive and metastatic potential. *J Natl Cancer Inst* 84, 165-174.
- Hendrix, M.J., Seftor, E.A., Chu, Y.W., Trevor, K.T., Seftor, R.E., 1996, Role of intermediate filaments in migration, invasion and metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 15, 507-525.
- Hendrix, M.J., Seftor, E.A., Seftor, R.E., Trevor, K.T., 1997, Experimental co-expression of vimentin and keratin intermediate filaments in human breast cancer cells results in phenotypic interconversion and increased invasive behavior. *Am J Pathol* 150, 483-495.
- Hendrix, M.J., Seftor, E.A., Kirschmann, D.A., Seftor, R.E., 2000, Molecular biology of breast cancer metastasis. Molecular expression of vascular markers by aggressive breast cancer cells. *Breast Cancer Res* 2, 417-422.
- Hendrix, M.J., Seftor, E.A., Meltzer, P.S., Gardner, L.M., Hess, A.R., Kirschmann, D.A., Schattman, G.C., Seftor, R.E., 2001, Expression and functional significance of VE-cadherin in aggressive human melanoma cells: role in vasculogenic mimicry. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 8018-8023.
- Hendrix, M.J., Seftor, E.A., Hess, A.R., Seftor, R.E., 2003a, Vasculogenic mimicry and tumour-cell plasticity: lessons from melanoma. *Nat Rev Cancer* 3, 411-421.
- Hendrix, M.J., Seftor, E.A., Kirschmann, D.A., Quaranta, V., Seftor, R.E., 2003b, Remodeling of the microenvironment by aggressive melanoma tumor cells. *Ann N Y Acad Sci* 995, 151-161.
- Hennessy, B.T., Gonzalez-Angulo, A.M., Hortobagyi, G.N., Cristofanilli, M., Kau, S.W., Broglio, K., Fornage, B., Singletary, S.E., Sahin, A., Buzdar, A.U., Valero, V., 2006, Disease-free and overall survival after pathologic complete disease remission of cytologically proven inflammatory breast carcinoma axillary lymph node metastases after primary systemic chemotherapy. *Cancer* 106, 1000-1006.

- Herman, C.J., Moesker, O., Kant, A., Huysmans, A., Vooijs, G.P., Ramaekers, F.C., 1983, Is renal cell (Grawitz) tumor a carcinosarcoma? Evidence from analysis of intermediate filament types. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 44, 73-83.
- Hess, A.R., Seftor, E.A., Seftor, R.E., Hendrix, M.J., 2003, Phosphoinositide 3-kinase regulates membrane Type 1-matrix metalloproteinase (MMP) and MMP-2 activity during melanoma cell vasculogenic mimicry. *Cancer Res* 63, 4757-4762.
- Hicklin, D.J., Ellis, L.M., 2005, Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. *J Clin Oncol* 23, 1011-1027.
- Higgins, K.J., Liu, S., Abdelrahim, M., Yoon, K., Vanderlaag, K., Porter, W., Metz, R.P., Safe, S., 2006, Vascular endothelial growth factor receptor-2 expression is induced by 17beta-estradiol in ZR-75 breast cancer cells by estrogen receptor alpha/Sp proteins. *Endocrinology* 147, 3285-3295.
- Hill, J.M., Zalos, G., Halcox, J.P., Schenke, W.H., Waclawiw, M.A., Quyyumi, A.A., Finkel, T., 2003, Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *N Engl J Med* 348, 593-600.
- Hillen, F., Griffioen, A.W., 2007, Tumour vascularization: sprouting angiogenesis and beyond. *Cancer Metastasis Rev* 26, 489-502.
- Hla, T., Bishop-Bailey, D., Liu, C.H., Schaefer, H.J., Trifan, O.C., 1999, Cyclooxygenase-1 and -2 isoenzymes. *Int J Biochem Cell Biol* 31, 551-557.
- Hoang, M.P., Selim, M.A., Bentley, R.C., Burchette, J.L., Shea, C.R., 2001, CD34 expression in desmoplastic melanoma. *J Cutan Pathol* 28, 508-512.
- Hoar, F.J., Chaudhri, S., Wadley, M.S., Stonelake, P.S., 2003, Co-expression of vascular endothelial growth factor C (VEGF-C) and c-erbB2 in human breast carcinoma. *Eur J Cancer* 39, 1698-1703.
- Holash, J., Maisonpierre, P.C., Compton, D., Boland, P., Alexander, C.R., Zagzag, D., Yancopoulos, G.D., Wiegand, S.J., 1999, Vessel cooption, regression, and growth in tumors mediated by angiopoietins and VEGF. *Science* 284, 1994-1998.
- Holmgren, L., O'Reilly, M.S., Folkman, J., 1995, Dormancy of micrometastases: balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression. *Nat Med* 1, 149-153.
- Horak, E.R., Leek, R., Klenk, N., LeJeune, S., Smith, K., Stuart, N., Greenall, M., Stepniowska, K., Harris, A.L., 1992, Angiogenesis, assessed by platelet/endothelial cell adhesion molecule antibodies, as indicator of node metastases and survival in breast cancer. *Lancet* 340, 1120-1124.
- Hotes, J.L., Ellison, L.F., Howe, H.L., Friesen, I., Kohler, B., 2004, Variation in breast cancer counts using SEER and IARC multiple primary coding rules. *Cancer Causes Control* 15, 185-191.
- Howe, L.R., Dannenberg, A.J., 2003, COX-2 inhibitors for the prevention of breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 8, 31-43.
- Huang, M., Stolina, M., Sharma, S., Mao, J.T., Zhu, L., Miller, P.W., Wollman, J., Herschman, H., Dubinett, S.M., 1998, Non-small cell lung cancer cyclooxygenase-2-dependent regulation of cytokine balance in lymphocytes and macrophages: up-regulation of interleukin 10 and down-regulation of interleukin 12 production. *Cancer Res* 58, 1208-1216.
- Hunter, C.P., Redmond, C.K., Chen, V.W., Austin, D.F., Greenberg, R.S., Correa, P., Muss, H.B., Forman, M.R., Wesley, M.N., Blacklow, R.S., et al., 1993, Breast cancer: factors associated with stage at diagnosis in black and white women. Black/White Cancer Survival Study Group. *J Natl Cancer Inst* 85, 1129-1137.

- Hyder, S.M., Stancel, G.M., Chiappetta, C., Murthy, L., Boettger-Tong, H.L., Makela, S., 1996, Uterine expression of vascular endothelial growth factor is increased by estradiol and tamoxifen. *Cancer Res* 56, 3954-3960.
- Hyder, S.M., Murthy, L., Stancel, G.M., 1998, Progesterone regulation of vascular endothelial growth factor in human breast cancer cells. *Cancer Res* 58, 392-395.
- Hyder, S.M., Nawaz, Z., Chiappetta, C., Stancel, G.M., 2000, Identification of functional estrogen response elements in the gene coding for the potent angiogenic factor vascular endothelial growth factor. *Cancer Res* 60, 3183-3190.
- Hyder, S.M., Chiappetta, C., Stancel, G.M., 2001, Pharmacological and endogenous progestins induce vascular endothelial growth factor expression in human breast cancer cells. *Int J Cancer* 92, 469-473.
- Hyder, S.M., 2006, Sex-steroid regulation of vascular endothelial growth factor in breast cancer. *Endocr Relat Cancer* 13, 667-687.
- Ibrahim, E.M., Ezzat, A.A., Baloush, A., Hussain, Z.H., Mohammed, G.H., 2000, Pregnancy-associated breast cancer: a case-control study in a young population with a high-fertility rate. *Med Oncol* 17, 293-300.
- Illera, J.C., Silvan, G., Pérez-Alenza, M.D., 2002, The role of IGF-I, binding proteins (BP3) and its receptor in canine inflammatory mammary tumors. In: *International Symposium in Cancer, New Trends in cancer for the 21st Century*.
- Illera, J.C., Silvan, G., Pérez-Alenza, M.D., Sanchez-Archidona, A.R., Nieto, A., Peña, L., 2003, The possible role of IGF-I and androgens in the development of canine inflammatory mammary carcinoma. Springer-Verlag, New York.
- Illera, J.C., Perez-Alenza, M.D., Nieto, A., Jimenez, M.A., Silvan, G., Dunner, S., Peña, L., 2006, Steroids and receptors in canine mammary cancer. *Steroids* 71, 541-548.
- Jacquemier, J., Mathoulin-Portier, M.P., Valtola, R., Charafe-Jauffret, E., Geneix, J., Houvenaeghel, G., Puig, B., Bardou, V.J., Hassoun, J., Viens, P., Birnbaum, D., 2000, Prognosis of breast-carcinoma lymphagenesis evaluated by immunohistochemical investigation of vascular-endothelial-growth-factor receptor 3. *Int J Cancer* 89, 69-73.
- Jain, R.K., 2003, Molecular regulation of vessel maturation. *Nat Med* 9, 685-693.
- Jaiyesimi, I.A., Buzdar, A.U., Hortobagyi, G., 1992, Inflammatory breast cancer: a review. *J Clin Oncol* 10, 1014-1024.
- Jeltsch, M., Kaipainen, A., Joukov, V., Meng, X., Lakso, M., Rauvala, H., Swartz, M., Fukumura, D., Jain, R.K., Alitalo, K., 1997, Hyperplasia of lymphatic vessels in VEGF-C transgenic mice. *Science* 276, 1423-1425.
- Jones, M.K., Wang, H., Peskar, B.M., Levin, E., Itani, R.M., Sarfeh, I.J., Tarnawski, A.S., 1999, Inhibition of angiogenesis by nonsteroidal anti-inflammatory drugs: insight into mechanisms and implications for cancer growth and ulcer healing. *Nat Med* 5, 1418-1423.
- Joukov, V., Pajusola, K., Kaipainen, A., Chilov, D., Lahtinen, I., Kukk, E., Saksela, O., Kalkkinen, N., Alitalo, K., 1996, A novel vascular endothelial growth factor, VEGF-C, is a ligand for the Flt4 (VEGFR-3) and KDR (VEGFR-2) receptor tyrosine kinases. *EMBO J* 15, 1751.
- Jussila, L., Alitalo, K., 2002, Vascular growth factors and lymphangiogenesis. *Physiol Rev* 82, 673-700.
- Kahn, H.J., Bailey, D., Marks, A., 2002, Monoclonal antibody D2-40, a new marker of lymphatic endothelium, reacts with Kaposi's sarcoma and a subset of angiosarcomas. *Mod Pathol* 15, 434-440.

- Kahn, H.J., Marks, A., 2002, A new monoclonal antibody, D2-40, for detection of lymphatic invasion in primary tumors. *Lab Invest* 82, 1255-1257.
- Kaipainen, A., Korhonen, J., Mustonen, T., van Hinsbergh, V.W., Fang, G.H., Dumont, D., al., E., 1995, Expression of the *fms*-like tyrosine kinase 4 gene becomes restricted to lymphatic endothelium during development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 3566-3570.
- Karpanen, T., Egeblad, M., Karkkainen, M.J., Kubo, H., Yla-Herttuala, S., Jaattela, M., Alitalo, K., 2001, Vascular endothelial growth factor C promotes tumor lymphangiogenesis and intralymphatic tumor growth. *Cancer Res* 61, 1786-1790.
- Kato, Y., Asano, K., Mogi, T., Kutara, K., Teshima, K., Edamura, K., Tsumagari, S., Hasegawa, A., Tanaka, S., 2007, Clinical significance of circulating vascular endothelial growth factor in dogs with mammary gland tumors. *J Vet Med Sci* 69, 77-80.
- Khan, K.N., Knapp, D.W., Denicola, D.B., Harris, R.K., 2000, Expression of cyclooxygenase-2 in transitional cell carcinoma of the urinary bladder in dogs. *Am J Vet Res* 61, 478-481.
- Khan, K.N., Stanfield, K.M., Trajkovic, D., Knapp, D.W., 2001, Expression of cyclooxygenase-2 in canine renal cell carcinoma. *Vet Pathol* 38, 116-119.
- Kinoshita, J., Kitamura, K., Kabashima, A., Saeki, H., Tanaka, S., Sugimachi, K., 2001, Clinical significance of vascular endothelial growth factor-C (VEGF-C) in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 66, 159-164.
- Kirkpatrick, K., Ogunkolade, W., Elkak, A., Bustin, S., Jenkins, P., Ghilchik, M., Mokbel, K., 2002, The mRNA expression of cyclo-oxygenase-2 (COX-2) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in human breast cancer. *Curr Med Res Opin* 18, 237-241.
- Kleer, C.G., van Golen, K.L., Merajver, S.D., 2000, Molecular biology of breast cancer metastasis. Inflammatory breast cancer: clinical syndrome and molecular determinants. *Breast Cancer Res* 2, 423-429.
- Kleer, C.G., van Golen, K.L., Braun, T., Merajver, S.D., 2001, Persistent E-cadherin expression in inflammatory breast cancer. *Mod Pathol* 14, 458-464.
- Kleer, C.G., van Golen, K.L., Zhang, Y., Wu, Z.F., Rubin, M.A., Merajver, S.D., 2002, Characterization of RhoC expression in benign and malignant breast disease: a potential new marker for small breast carcinomas with metastatic ability. *Am J Pathol* 160, 579-584.
- Klotz, I.D., 1869, *Ueber mastitis carcinomatosa gravidarum et Lactarium*. Halle: These, 30 p.
- Knight, C.D., Jr., Martin, J.K., Jr., Welch, J.S., Ingle, J.N., Gaffey, T.A., Martinez, A., 1986, Surgical considerations after chemotherapy and radiation therapy for inflammatory breast cancer. *Surgery* 99, 385-391.
- Kobayashi, H., Sato, N., Kawamoto, S., Saga, T., Hiraga, A., Haque, T.L., Ishimori, T., Konishi, J., Togashi, K., Brechbiel, M.W., 2001, Comparison of the macromolecular MR contrast agents with ethylenediamine-core versus ammonia-core generation-6 polyamidoamine dendrimer. *Bioconjug Chem* 12, 100-107.
- Kobayashi, H., Shirakawa, K., Kawamoto, S., Saga, T., Sato, N., Hiraga, A., Watanabe, I., Heike, Y., Togashi, K., Konishi, J., Brechbiel, M.W., Wakasugi, H., 2002, Rapid accumulation and internalization of radiolabeled herceptin in an inflammatory breast cancer xenograft with vasculogenic mimicry predicted by the contrast-enhanced dynamic MRI with the macromolecular contrast agent G6-(1B4M-Gd)(256). *Cancer Res* 62, 860-866.
- Kokal, W.A., Hill, L.R., Porudominsky, D., Beatty, J.D., Kemeny, M.M., Riihimaki, D.U., Terz, J.J., 1985, Inflammatory breast carcinoma: a distinct entity? *J Surg Oncol* 30, 152-155.

- Koyama, Y., Kaneko, K., Akazawa, K., Kanbayashi, C., Kanda, T., Hatakeyama, K., 2003, Vascular endothelial growth factor-C and vascular endothelial growth factor-d messenger RNA expression in breast cancer: association with lymph node metastasis. *Clin Breast Cancer* 4, 354-360.
- Kranz, A., Mattfeldt, T., Waltenberger, J., 1999, Molecular mediators of tumor angiogenesis: enhanced expression and activation of vascular endothelial growth factor receptor KDR in primary breast cancer. *Int J Cancer* 84, 293-298.
- Krause, D.S., Fackler, M.J., Civin, C.I., May, W.S., 1996, CD34: structure, biology, and clinical utility. *Blood* 87, 1-13.
- Krishnan, J., Kirkin, V., Steffen, A., Hegen, M., Weih, D., Tomarev, S., Wilting, J., Sleeman, J.P., 2003, Differential in vivo and in vitro expression of vascular endothelial growth factor (VEGF)-C and VEGF-D in tumors and its relationship to lymphatic metastasis in immunocompetent rats. *Cancer Res* 63, 713-722.
- Kuerer, H.M., Newman, L.A., Smith, T.L., Ames, F.C., Hunt, K.K., Dhingra, K., Theriault, R.L., Singh, G., Binkley, S.M., Sneige, N., Buchholz, T.A., Ross, M.I., McNeese, M.D., Buzdar, A.U., Hortobagyi, G.N., Singletary, S.E., 1999, Clinical course of breast cancer patients with complete pathologic primary tumor and axillary lymph node response to doxorubicin-based neoadjuvant chemotherapy. *J Clin Oncol* 17, 460-469.
- Kumar, V., Abbas, A.K., Fausto, N., Robbins, S.L., Cotran, R.S.R.p.b.o.d., 2005, Robbins and Cotran pathologic basis of disease, 7th ed. / [edited by] Vinay Kumar, Abul K. Abbas, Nelson Fausto ; with illustrations by James A. Perkins. Edition. Elsevier Saunders, Philadelphia, Pa. ; [London], xv, 1525 p. pp.
- Kunstfeld, R., Hirakawa, S., Hong, Y.K., Schacht, V., Lange-Asschenfeldt, B., Velasco, P., Lin, C., Fiebigler, E., Wei, X., Wu, Y., Hicklin, D., Bohlen, P., Detmar, M., 2004, Induction of cutaneous delayed-type hypersensitivity reactions in VEGF-A transgenic mice results in chronic skin inflammation associated with persistent lymphatic hyperplasia. *Blood* 104, 1048-1057.
- Kurebayashi, J., Otsuki, T., Kunisue, H., Mikami, Y., Tanaka, K., Yamamoto, S., Sonoo, H., 1999, Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) family members in breast cancer. *Jpn J Cancer Res* 90, 977-981.
- Laakkonen, P., Porkka, K., Hoffman, J.A., Ruoslahti, E., 2002, A tumor-homing peptide with a targeting specificity related to lymphatic vessels. *Nat Med* 8, 751-755.
- Labelle, P., De Cock, H.E., 2005, Metastatic tumors to the adrenal glands in domestic animals. *Vet Pathol* 42, 52-58.
- Lala, P.K., Saarloos, M.N., 1994, Prostaglandins and the host immune system: application of prostaglandin inhibitors for cancer immunotherapy. Boca Raton: CRC Press.
- Lala, P.K., Al-Mutter, N., Orucevic, A., 1997, Effects of chronic indomethacin therapy on the development and progression of spontaneous mammary tumors in C3H/HEJ mice. *Int J Cancer* 73, 371-380.
- Le, M.G., Arriagada, R., Bahi, J., Pfeiffer, F., Cammoun, M., Tabbane, F., Rubino, C., 2006, Are risk factors for breast cancer similar in women with inflammatory breast cancer and in those with non-inflammatory breast cancer? *Breast* 15, 355-362.
- Leahy, K.M., Ornberg, R.L., Wang, Y., Zweifel, B.S., Koki, A.T., Masferrer, J.L., 2002, Cyclooxygenase-2 inhibition by celecoxib reduces proliferation and induces apoptosis in angiogenic endothelial cells in vivo. *Cancer Res* 62, 625-631.
- Learmont, G.E., 1916, Acute mammary carcinoma, (Volkmann's Mastitis Carcinomatosa). *Can Med Assoc J* 6, 499-511.

- Lee, A.H., Happerfield, L.C., Bobrow, L.G., 1997, Comparison of four endothelial markers for assessing angiogenesis in carcinoma of the breast. *J Cellul Pathol* 2, 67-73.
- Lee, B., Tannenbaum, N., 1924, Inflammatory carcinoma of the breast: A report of twenty-eight cases from the breast clinic of Memorial Hospital. *Surg Gynecol Obstet* 39, 580-595.
- Lee, Y.J., Nagai, N., Siar, C.H., Nakano, K., Nagatsuka, H., Tsujigiwa, H., Roan, C.H., Gunduz, M., 2002, Angioarchitecture of primary oral malignant melanomas. *J Histochem Cytochem* 50, 1555-1562.
- Lee, Y.T., 1983, Breast carcinoma: pattern of metastasis at autopsy. *J Surg Oncol* 23, 175-180.
- Leitch, A., 1909, Peau d'orange in acute mammary carcinoma: its causes and diagnostic value. *Lancet Oncol* 1, 861-863.
- Levine, P.H., Steinhorn, S.C., Ries, L.G., Aron, J.L., 1985, Inflammatory breast cancer: the experience of the surveillance, epidemiology, and end results (SEER) program. *J Natl Cancer Inst* 74, 291-297.
- Levine, P.H., 2004, Factors for the development of aggressive inflammatory and non-inflammatory breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 88 Suppl 1:S91.
- Levine, P.H., Veneroso, C., 2008, The epidemiology of inflammatory breast cancer. *Semin Oncol* 35, 11-16.
- Li, Y.S., Kaneko, M., Amatya, V.J., Takeshima, Y., Arihiro, K., Inai, K., 2006, Expression of vascular endothelial growth factor-C and its receptor in invasive micropapillary carcinoma of the breast. *Pathol Int* 56, 256-261.
- Liang, Y., Hyder, S.M., 2005, Proliferation of endothelial and tumor epithelial cells by progestin-induced vascular endothelial growth factor from human breast cancer cells: paracrine and autocrine effects. *Endocrinology* 146, 3632-3641.
- Liao, D.J., Dickson, R.B., 2002, Roles of androgens in the development, growth, and carcinogenesis of the mammary gland. *J Steroid Biochem Mol Biol* 80, 175-189.
- Linderholm, B., Tavelin, B., Grankvist, K., Henriksson, R., 1998, Vascular endothelial growth factor is of high prognostic value in node-negative breast carcinoma. *J Clin Oncol* 16, 3121-3128.
- Linderholm, B., Tavelin, B., Grankvist, K., Henriksson, R., 1999, Does vascular endothelial growth factor (VEGF) predict local relapse and survival in radiotherapy-treated node-negative breast cancer? *Br J Cancer* 81, 727-732.
- Linderholm, B., Grankvist, K., Wilking, N., Johansson, M., Tavelin, B., Henriksson, R., 2000, Correlation of vascular endothelial growth factor content with recurrences, survival, and first relapse site in primary node-positive breast carcinoma after adjuvant treatment. *J Clin Oncol* 18, 1423-1431.
- Liu, C., Huang, H., Donate, F., Dickinson, C., Santucci, R., El-Sheikh, A., Vessella, R., Edgington, T.S., 2002, Prostate-specific membrane antigen directed selective thrombotic infarction of tumors. *Cancer Res* 62, 5470-5475.
- Listrom, M.B., Dalton, L.W., 1987, Comparison of keratin monoclonal antibodies MAK-6, AE1:AE3, and CAM-5.2. *Am J Clin Pathol* 88, 297-301.
- Longatto Filho, A., Martins, A., Costa, S.M., Schmitt, F.C., 2005, VEGFR-3 expression in breast cancer tissue is not restricted to lymphatic vessels. *Pathol Res Pract* 201, 93-99.
- Lopez, E., Guerrero, R., Nunez, M.I., del Moral, R., Villalobos, M., Martinez-Galan, J., Valenzuela, M.T., Munoz-Gamez, J.A., Oliver, F.J., Martin-Oliva, D., Ruiz de Almodovar, J.M., 2005, Early and late skin reactions to radiotherapy for breast cancer and their correlation with radiation-induced DNA damage in lymphocytes. *Breast Cancer Res* 7, R690-698.
- Lopez, M.J., Porter, K.A., 1996, Inflammatory breast cancer. *Surg Clin North Am* 76, 411-429.

- Losordo, D.W., Isner, J.M., 2001, Estrogen and angiogenesis: A review. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21, 6-12.
- Low, J.A., Berman, A.W., Steinberg, S.M., Danforth, D.N., Lippman, M.E., Swain, S.M., 2004, Long-term follow-up for locally advanced and inflammatory breast cancer patients treated with multimodality therapy. *J Clin Oncol* 22, 4067-4074.
- Lucas, F.V., Perez-Mesa, C., 1978, Inflammatory carcinoma of the breast. *Cancer* 41, 1595-1605.
- Ludovini, V., Sidoni, A., Pistola, L., Bellezza, G., De Angelis, V., Gori, S., Mosconi, A.M., Bisagni, G., Cherubini, R., Bian, A.R., Rodino, C., Sabbatini, R., Mazzocchi, B., Bucciarelli, E., Tonato, M., Colozza, M., 2003, Evaluation of the prognostic role of vascular endothelial growth factor and microvessel density in stages I and II breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 81, 159-168.
- Luong, R.H., Baer, K.E., Craft, D.M., Ettinger, S.N., Scase, T.J., Bergman, P.J., 2006, Prognostic significance of intratumoral microvessel density in canine soft-tissue sarcomas. *Vet Pathol* 43, 622-631.
- Maalej, M., Frikha, H., Ben Salem, S., Daoud, J., Bouaouina, N., Ben Abdallah, M., Ben Romdhane, K., 1999, [Breast cancer in Tunisia: clinical and epidemiological study]. *Bull Cancer* 86, 302-306.
- Machein, M.R., Renninger, S., de Lima-Hahn, E., Plate, K.H., 2003, Minor contribution of bone marrow-derived endothelial progenitors to the vascularization of murine gliomas. *Brain Pathol* 13, 582-597.
- Maiolino, P., Papparella, S., Restucci, B., De Vico, G., 2001, Angiogenesis in squamous cell carcinomas of canine skin: an immunohistochemical and quantitative analysis. *J Comp Pathol* 125, 117-121.
- Majima, M., Isono, M., Ikeda, Y., Hayashi, I., Hatanaka, K., Harada, Y., Katsumata, O., Yamashina, S., Katori, M., Yamamoto, S., 1997, Significant roles of inducible cyclooxygenase (COX)-2 in angiogenesis in rat sponge implants. *Jpn J Pharmacol* 75, 105-114.
- Maloisel, F., Dufour, P., Bergerat, J.P., Herbrecht, R., Duclos, B., Boilletot, A., Giron, C., Jaeck, D., Haennel, P., Jung, G., et al., 1990, Results of initial doxorubicin, 5-fluorouracil, and cyclophosphamide combination chemotherapy for inflammatory carcinoma of the breast. *Cancer* 65, 851-855.
- Mandriota, S.J., Jussila, L., Jeltsch, M., Compagni, A., Baetens, D., Prevo, R., Banerji, S., Huarte, J., Montesano, R., Jackson, D.G., Orci, L., Alitalo, K., Christofori, G., Pepper, M.S., 2001, Vascular endothelial growth factor-C-mediated lymphangiogenesis promotes tumour metastasis. *EMBO J* 20, 672-682.
- Maniotis, A.J., Folberg, R., Hess, A., Seftor, E.A., Gardner, L.M., Pe'er, J., Trent, J.M., Meltzer, P.S., Hendrix, M.J., 1999, Vascular channel formation by human melanoma cells in vivo and in vitro: vasculogenic mimicry. *Am J Pathol* 155, 739-752.
- Marinho, V.F., Metze, K., Sanches, F.S., Rocha, G.F., Gobbi, H., 2008, Lymph vascular invasion in invasive mammary carcinomas identified by the endothelial lymphatic marker D2-40 is associated with other indicators of poor prognosis. *BMC Cancer* 8, 64.
- Martin, L., Green, B., Renshaw, C., Lowe, D., Rudland, P., Leinster, S.J., Winstanley, J., 1997, Examining the technique of angiogenesis assessment in invasive breast cancer. *Br J Cancer* 76, 1046-1054.
- Masferrer, J.L., Leahy, K.M., Koki, A.T., Zweifel, B.S., Settle, S.L., Woerner, B.M., Edwards, D.A., Flickinger, A.G., Moore, R.J., Seibert, K., 2000, Antiangiogenic and antitumor activities of cyclooxygenase-2 inhibitors. *Cancer Res* 60, 1306-1311.
- Mason, G., Johnson, O., 2008, Inflammatory breast cancer: patient advocate view. *Semin Oncol* 35, 87-91.

- McCarthy, N.J., Yang, X., Linnoila, I.R., Merino, M.J., Hewitt, S.M., Parr, A.L., Paik, S., Steinberg, S.M., Hartmann, D.P., Mourali, N., Levine, P.H., Swain, S.M., 2002, Microvessel density, expression of estrogen receptor alpha, MIB-1, p53, and c-erbB-2 in inflammatory breast cancer. *Clin Cancer Res* 8, 3857-3862.
- McEntee, M.F., Cates, J.M., Neilsen, N., 2002, Cyclooxygenase-2 expression in spontaneous intestinal neoplasia of domestic dogs. *Vet Pathol* 39, 428-436.
- Medri, L., Nanni, O., Volpi, A., Scarpi, E., Dubini, A., Riccobon, A., Beccioli, A., Bianchi, S., Amadori, D., 2000, Tumor microvessel density and prognosis in node-negative breast cancer. *Int J Cancer* 89, 74-80.
- Meissner, W.A., Warren, S., 1971, Sites of metastases at autopsy, Vol 1. St. Louis: C.V. Mosby Co.
- Meyer, A.C., Dockerty, M.B., Harrington, S.W., 1948, Inflammatory carcinoma of the breast. *Surg Gynecol Obstet* 87, 417-424.
- Milias, S., Kalekou, H., Bobos, M., Karayannopoulou, G., Gerasimidou, D., Nenopoulou, H., Panoussi, E., Kostopoulos, I., 2007, Immunohistochemical investigation of CD34 antigen in male breast carcinoma. *Clin Exp Med* 7, 122-126.
- Millanta, F., Calandrella, M., Bari, G., Niccolini, M., Vannozzi, I., Poli, A., 2005, Comparison of steroid receptor expression in normal, dysplastic, and neoplastic canine and feline mammary tissues. *Res Vet Sci* 79, 225-232.
- Millanta, F., Citi, S., Della Santa, D., Porciani, M., Poli, A., 2006a, COX-2 expression in canine and feline invasive mammary carcinomas: correlation with clinicopathological features and prognostic molecular markers. *Breast Cancer Res Treat* 98, 115-120.
- Millanta, F., Silvestri, G., Vaselli, C., Citi, S., Pisani, G., Lorenzi, D., Poli, A., 2006b, The role of vascular endothelial growth factor and its receptor Flk-1/KDR in promoting tumour angiogenesis in feline and canine mammary carcinomas: a preliminary study of autocrine and paracrine loops. *Res Vet Sci* 81, 350-357.
- Millauer, B., Witzigmann-Voos, S., Schnurch, H., Martinez, R., Moller, N.P., Risau, W., Ullrich, A., 1993, High affinity VEGF binding and developmental expression suggest Flk-1 as a major regulator of vasculogenesis and angiogenesis. *Cell* 72, 835-846.
- Mirkin, S., Archer, D.F., 2004, Effects of mifepristone on vascular endothelial growth factor and thrombospondin-1 mRNA in Ishikawa cells: implication for the endometrial effects of mifepristone. *Contraception* 70, 327-333.
- Misdorp, W., Cotchin, E., Hampe, J.F., Jabara, A.G., von Sandersleben, J., 1971, Canine malignant mammary tumours. I. Sarcomas. *Vet Pathol* 8, 99-117.
- Misdorp, W., Cotchin, E., Hampe, J.F., Jabara, A.G., von Sandersleben, J., 1972, Canine malignant mammary tumors 2. Adenocarcinomas, solid carcinomas and spindle cell carcinomas. *Vet Pathol* 9, 447-470.
- Misdorp, W., Cotchin, E., Hampe, J.F., Jabara, A.G., Von Sandersleben, J., 1973, Canine malignant mammary tumors. 3. Special types of carcinomas, malignant mixed tumors. *Vet Pathol* 10, 241-256.
- Misdorp, W., Else, R.W., Hellmen, E., Lipscomb, T.P., 1999, Histological Classification of Mammary Tumors of the Dog and the Cat. *World Human Organization VII*.
- Mochizuki, S., Umemura, S., Tokuda, Y., Tajima, T., Mitomi, T., Osamura, R.Y., 1997, A study of 46 cumulative breast cancer autopsy cases. *Tokai J Exp Clin Med* 22, 19-25.
- Moe, L., 2001, Population-based incidence of mammary tumours in some dog breeds. *J Reprod Fertil Suppl* 57, 439-443.

- Mohammad, A.M., Abdel, H.A., Abdel, W., Ahmed, A.M., Wael, T., Eiman, G., 2006, Expression of cyclooxygenase-2 and 12-lipoxygenase in human breast cancer and their relationship with HER-2/neu and hormonal receptors: impact on prognosis and therapy. *Indian J Cancer* 43, 163-168.
- Mohammed, R.A., Green, A., El-Shikh, S., Paish, E.C., Ellis, I.O., Martin, S.G., 2007a, Prognostic significance of vascular endothelial cell growth factors -A, -C and -D in breast cancer and their relationship with angio- and lymphangiogenesis. *Br J Cancer* 96, 1092-1100.
- Mohammed, R.A., Martin, S.G., Gill, M.S., Green, A.R., Paish, E.C., Ellis, I.O., 2007b, Improved methods of detection of lymphovascular invasion demonstrate that it is the predominant method of vascular invasion in breast cancer and has important clinical consequences. *Am J Surg Pathol* 31, 1825-1833.
- Mohammed, S.I., Khan, K.N., Sellers, R.S., Hayek, M.G., DeNicola, D.B., Wu, L., Bonney, P.L., Knapp, D.W., 2004, Expression of cyclooxygenase-1 and 2 in naturally-occurring canine cancer. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 70, 479-483.
- Moinfar, F., Okcu, M., Tsybrovskyy, O., Regitnig, P., Lax, S.F., Weybora, W., Ratschek, M., Tavassoli, F.A., Denk, H., 2003, Androgen receptors frequently are expressed in breast carcinomas: potential relevance to new therapeutic strategies. *Cancer* 98, 703-711.
- Monlux, A.W., Roszel, J.F., MacVean, D.W., Palmer, T.W., 1977, Classification of epithelial canine mammary tumors in a defined population. *Vet Pathol* 14, 194-217.
- Montrucchio, G., Sapino, A., Bussolati, B., Ghisolfi, G., Rizea-Savu, S., Silvestro, L., Lupia, E., Camussi, G., 1998, Potential angiogenic role of platelet-activating factor in human breast cancer. *Am J Pathol* 153, 1589-1596.
- Moore, A.S., Madewell, B.R., Lund, J.K., 1989, Immunohistochemical evaluation of intermediate filament expression in canine and feline neoplasms. *Am J Vet Res* 50, 88-92.
- Moore, T., Lee, A.H., 2001, Expression of CD34 and bcl-2 in phyllodes tumours, fibroadenomas and spindle cell lesions of the breast. *Histopathology* 38, 62-67.
- Morphopoulos, G., Pearson, M., Ryder, W.D., Howell, A., Harris, M., 1996, Tumour angiogenesis as a prognostic marker in infiltrating lobular carcinoma of the breast. *J Pathol* 180, 44-49.
- Moulton, J.E., Taylor, D.O., Dorn, C.R., Andersen, A.C., 1970, Canine mammary tumors. *Pathol Vet* 7, 289-320.
- Mourali, N., Tabbane, F., Djazizi, M., al., E., 1977, Fulminating breast cancer: clinical features, Vol 1. Marcell Dekker, New York.
- Mourali, N., Muenz, L.R., Tabbane, F., Belhassen, S., Bahi, J., Levine, P.H., 1980, Epidemiologic features of rapidly progressing breast cancer in Tunisia. *Cancer* 46, 2741-2746.
- Mourali, N., Tabbane, F., Muenz, L.R., Behi, J., Ben Moussa, F., Jaziri, M., Levine, P.H., 1993, Ten-year results utilizing chemotherapy as primary treatment in nonmetastatic, rapidly progressing breast cancer. *Cancer Invest* 11, 363-370.
- Mueller, M.D., Vigne, J.L., Minchenko, A., Lebovic, D.I., Leitman, D.C., Taylor, R.N., 2000, Regulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) gene transcription by estrogen receptors alpha and beta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 10972-10977.
- Muller, W.A., 1996, Leucocyte typing VI. White cell differentiation antigens. In: 6th International Workshop and Conference, Japan, 1997, pp. 362-364.
- Mygind, H., Nielsen, B., Moe, D., Clausen, H., Dabelsteen, E., Clausen, P.P., 1988, Antikeratin antibodies in routine diagnostic pathology. A comparison of 10 different commercial antikeratins. *APMIS* 96, 1009-1022.

- Mylona, E., Alexandrou, P., Giannopoulou, I., Liapis, G., Sofia, M., Keramopoulos, A., Nakopoulou, L., 2007a, The prognostic value of vascular endothelial growth factors (VEGFs)-A and -B and their receptor, VEGFR-1, in invasive breast carcinoma. *Gynecol Oncol* 104, 557-563.
- Mylona, E., Alexandrou, P., Mpakali, A., Giannopoulou, I., Liapis, G., Markaki, S., Keramopoulos, A., Nakopoulou, L., 2007b, Clinicopathological and prognostic significance of vascular endothelial growth factors (VEGF)-C and -D and VEGF receptor 3 in invasive breast carcinoma. *Eur J Surg Oncol* 33, 294-300.
- Mylona, E., Nomikos, A., Alexandrou, P., Giannopoulou, I., Keramopoulos, A., Nakopoulou, L., 2007c, Lymphatic and blood vessel morphometry in invasive breast carcinomas: relation with proliferation and VEGF-C and -D proteins expression. *Histol Histopathol* 22, 825-835.
- Nagy, J.A., Vasile, E., Feng, D., Sundberg, C., Brown, L.F., Detmar, M.J., Lawitts, J.A., Benjamin, L., Tan, X., Manseau, E.J., Dvorak, A.M., Dvorak, H.F., 2002, Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor induces lymphangiogenesis as well as angiogenesis. *J Exp Med* 196, 1497-1506.
- Nahleh, Z., 2008, Androgen receptor as a target for the treatment of hormone receptor-negative breast cancer: an uncharted territory. *Future Oncol* 4, 15-21.
- Nakamura, J., Savinov, A., Lu, Q., Brodie, A., 1996, Estrogen regulates vascular endothelial growth/permeability factor expression in 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced rat mammary tumors. *Endocrinology* 137, 5589-5596.
- Nakamura, J., Lu, Q., Aberdeen, G., Albrecht, E., Brodie, A., 1999, The effect of estrogen on aromatase and vascular endothelial growth factor messenger ribonucleic acid in the normal nonhuman primate mammary gland. *J Clin Endocrinol Metab* 84, 1432-1437.
- Nakamura, Y., Yasuoka, H., Tsujimoto, M., Yang, Q., Imabun, S., Nakahara, M., Nakao, K., Nakamura, M., Mori, I., Kakudo, K., 2003a, Flt-4-positive vessel density correlates with vascular endothelial growth factor-d expression, nodal status, and prognosis in breast cancer. *Clin Cancer Res* 9, 5313-5317.
- Nakamura, Y., Yasuoka, H., Tsujimoto, M., Yang, Q., Imabun, S., Nakahara, M., Nakao, K., Nakamura, M., Mori, I., Kakudo, K., 2003b, Prognostic significance of vascular endothelial growth factor D in breast carcinoma with long-term follow-up. *Clin Cancer Res* 9, 716-721.
- Nakamura, Y., Yasuoka, H., Tsujimoto, M., Yang, Q., Tsukiyama, A., Imabun, S., Nakahara, M., Nakao, K., Nakamura, M., Mori, I., Kakudo, K., 2003c, Clinicopathological significance of vascular endothelial growth factor-C in breast carcinoma with long-term follow-up. *Mod Pathol* 16, 309-314.
- Nakamura, Y., Yasuoka, H., Tsujimoto, M., Imabun, S., Nakahara, M., Nakao, K., Nakamura, M., Mori, I., Kakudo, K., 2005, Lymph vessel density correlates with nodal status, VEGF-C expression, and prognosis in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 91, 125-132.
- Nakopoulou, L., Stefanaki, K., Panayotopoulou, E., Giannopoulou, I., Athanassiadou, P., Gakiopoulou-Givalou, H., Louvrou, A., 2002, Expression of the vascular endothelial growth factor receptor-2/Flk-1 in breast carcinomas: correlation with proliferation. *Hum Pathol* 33, 863-870.
- Nasu, R., Kimura, H., Akagi, K., Murata, T., Tanaka, Y., 1999, Blood flow influences vascular growth during tumour angiogenesis. *Br J Cancer* 79, 780-786.
- Newman, P.J., Berndt, M.C., Gorski, J., White, G.C., 2nd, Lyman, S., Paddock, C., Muller, W.A., 1990, PECAM-1 (CD31) cloning and relation to adhesion molecules of the immunoglobulin gene superfamily. *Science* 247, 1219-1222.
- Nichini, F.M., Goldman, L., Lapayowker, M.S., Levy, W.M., Maier, W., Rosemond, G.P., 1972, Inflammatory carcinoma of the breast in a 12-year-old girl. *Arch Surg* 105, 505-508.

- Nieto, A., Peña, L., Perez-Alenza, M.D., Sanchez, M.A., Flores, J.M., Castano, M., 2000, Immunohistologic detection of estrogen receptor alpha in canine mammary tumors: clinical and pathologic associations and prognostic significance. *Vet Pathol* 37, 239-247.
- Nieto, A., Pérez-Alenza, M.D., Peña, L., 2002. Insulin-like growth factor I receptor (IGF-IR), progesteron receptor (PR) and androgen receptor (AR) are highly expressed in canine inflammatory mammary carcinoma. In: 20th Meeting of European Society of Veterinary Pathology.
- Nigro, J.M., Baker, S.J., Preisinger, A.C., Jessup, J.M., Hostetter, R., Cleary, K., Bigner, S.H., Davidson, N., Baylin, S., Devilee, P., et al., 1989, Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumour types. *Nature* 342, 705-708.
- Niki, T., Iba, S., Tokunou, M., Yamada, T., Matsuno, Y., Hirohashi, S., 2000, Expression of vascular endothelial growth factors A, B, C, and D and their relationships to lymph node status in lung adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 6, 2431-2439.
- Nishio, H., Tada, J., Hashiyama, M., Hirn, J., Ingles-Esteve, J., Suda, T., 1997. MC7. CD34 workshop panel report. MC7. In: International Workshop and Conference, Kobe, Japan., pp. 974-976.
- O'Banion, M.K., Winn, V.D., Young, D.A., 1992, cDNA cloning and functional activity of a glucocorticoid-regulated inflammatory cyclooxygenase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 4888-4892.
- Ogawa, Y., Hai, E., Matsumoto, K., Ikeda, K., Tokunaga, S., Nagahara, H., Sakurai, K., Inoue, T., Nishiguchi, Y., 2008, Androgen receptor expression in breast cancer: relationship with clinicopathological factors and biomarkers. *Int J Clin Oncol* 13, 431-435.
- Oh, S.J., Jeltsch, M.M., Birkenhager, R., McCarthy, J.E., Weich, H.A., Christ, B., Alitalo, K., Wilting, J., 1997, VEGF and VEGF-C: specific induction of angiogenesis and lymphangiogenesis in the differentiated avian chorioallantoic membrane. *Dev Biol* 188, 96-109.
- Ohm, J.E., Shurin, M.R., Esche, C., Lotze, M.T., Carbone, D.P., Gabrilovich, D.I., 1999, Effect of vascular endothelial growth factor and FLT3 ligand on dendritic cell generation in vivo. *J Immunol* 163, 3260-3268.
- Ohm, J.E., Carbone, D.P., 2001, VEGF as a mediator of tumor-associated immunodeficiency. *Immunol Res* 23, 263-272.
- Ohm, J.E., Gabrilovich, D.I., Sempowski, G.D., Kisseleva, E., Parman, K.S., Nadaf, S., Carbone, D.P., 2003, VEGF inhibits T-cell development and may contribute to tumor-induced immune suppression. *Blood* 101, 4878-4886.
- Oliver, G., Detmar, M., 2002, The rediscovery of the lymphatic system: old and new insights into the development and biological function of the lymphatic vasculature. *Genes Dev* 16, 773-783.
- Oliva, E., Young, R.H., Clement, P.B., Bhan, A.K., Scully, R.E., 1995, Cellular benign mesenchymal tumors of the uterus. A comparative morphologic and immunohistochemical analysis of 33 highly cellular leiomyomas and six endometrial stromal nodules, two frequently confused tumors. *Am J Surg Pathol* 19, 757-768.
- Olofsson, B., Pajusola, K., von Euler, G., Chilov, D., Alitalo, K., Eriksson, U., 1996, Genomic organization of the mouse and human genes for vascular endothelial growth factor B (VEGF-B) and characterization of a second splice isoform. *J Biol Chem* 271, 19310-19317.
- Olofsson, B., Korpelainen, E., Pepper, M.S., Mandriota, S.J., Aase, K., Kumar, V., Gunji, Y., Jeltsch, M.M., Shibuya, M., Alitalo, K., Eriksson, U., 1998, Vascular endothelial growth factor B (VEGF-B) binds to VEGF receptor-1 and regulates plasminogen activator activity in endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 11709-11714.
- Olofsson, B., Jeltsch, M., Eriksson, U., Alitalo, K., 1999, Current biology of VEGF-B and VEGF-C. *Curr Opin Biotechnol* 10, 528-535.

- Oraedu, C.O., Pinnapureddy, P., Alrawi, S., Acinapura, A.J., Raju, R., 2001, Congestive heart failure mimicking inflammatory breast carcinoma: a case report and review of the literature. *Breast J* 7, 117-119.
- Pajusola, K., Aprelikova, O., Pelicci, G., Weich, H., Claesson-Welsh, L., Alitalo, K., 1994, Signalling properties of FLT4, a proteolytically processed receptor tyrosine kinase related to two VEGF receptors. *Oncogene* 9, 3545-3555.
- Palangie, T., Mosseri, V., Mihura, J., Campana, F., Beuzeboc, P., Dorval, T., Garcia-Giralt, E., Jouve, M., Scholl, S., Asselain, B., et al., 1994, Prognostic factors in inflammatory breast cancer and therapeutic implications. *Eur J Cancer* 30A, 921-927.
- Panades, M., Olivotto, I.A., Speers, C.H., Shenkier, T., Olivotto, T.A., Weir, L., Allan, S.J., Truong, P.T., 2005, Evolving treatment strategies for inflammatory breast cancer: a population-based survival analysis. *J Clin Oncol* 23, 1941-1950.
- Paradiso, A., Tommasi, S., Brandi, M., Marzullo, F., Simone, G., Lorusso, V., Mangia, A., De Lena, M., 1989, Cell kinetics and hormonal receptor status in inflammatory breast carcinoma. Comparison with locally advanced disease. *Cancer* 64, 1922-1927.
- Parham, D.M., Robertson, A.J., 1989, A retrospective study of breast carcinoma: causes of death and pattern of metastases. *Br J Cancer* 60, 394-396.
- Parodi, A.L., Mialot, J., P., Martin, P.M., Cotard, M., Raynaud, J.P., 1984, Canine and feline mammary cancers as animal models for hormone-dependent human breast tumors: relationships between steroid receptor profiles and survival rates. *Progr Cancer Res Ther* 31, 357-365.
- Partanen, T.A., Alitalo, K., Miettinen, M., 1999, Lack of lymphatic vascular specificity of vascular endothelial growth factor receptor 3 in 185 vascular tumors. *Cancer* 86, 2406-2412.
- Partanen, T.A., Paavonen, K., 2001, Lymphatic versus blood vascular endothelial growth factors and receptors in humans. *Microsc Res Tech* 55, 108-121.
- Parums, D.V., Cordell, J.L., Micklem, K., Heryet, A.R., Gatter, K.C., Mason, D.Y., 1990, JC70: a new monoclonal antibody that detects vascular endothelium associated antigen on routinely processed tissue sections. *J Clin Pathol* 43, 752-757.
- Pavlakakis, K., Messini, I., Vrekoussis, T., Yiannou, P., Keramopoulos, D., Louvrou, N., Liakakos, T., Stathopoulos, E.N., 2008, The assessment of angiogenesis and fibroblastic stromagenesis in hyperplastic and pre-invasive breast lesions. *BMC Cancer* 8, 88.
- Peña, L., Nieto, A.I., Perez-Alenza, D., Cuesta, P., Castano, M., 1998, Immunohistochemical detection of Ki-67 and PCNA in canine mammary tumors: relationship to clinical and pathologic variables. *J Vet Diagn Invest* 10, 237-246.
- Peña, L., Silvan, G., Nieto, A., al., E., 2002, Serum and tissue androgen concentrations in dogs with inflammatory mammary carcinoma (IMC) comparing to other mammary tumors. Androgen receptor status. In: 20th Meeting of European Society of Veterinary Pathology.
- Peña, L., Perez-Alenza, M.D., Rodriguez-Bertos, A., Nieto, A., 2003a, Canine inflammatory mammary carcinoma: histopathology, immunohistochemistry and clinical implications of 21 cases. *Breast Cancer Res Treat* 78, 141-148.
- Peña, L., Silvan, G., Perez-Alenza, M.D., Nieto, A., Illera, J.C., 2003b, Steroid hormone profile of canine inflammatory mammary carcinoma: a preliminary study. *J Steroid Biochem Mol Biol* 84, 211-216.
- Pérez-Alenza, M.D., Peña, L., Nieto, A.I., Castano, M., 1997, Clinical and pathological prognostic factors in canine mammary tumors. *Ann Ist Super Sanita* 33, 581-585.

- Pérez-Alenza, M.D., Rutteman, G.R., Peña, L., Beynen, A.C., Cuesta, A.P., 1998, Relation between habitual diet and canine mammary tumors in a case-control study. *J Vet Intern Med* 12, 132-139.
- Pérez-Alenza, M.D., Tabanera, E., Peña, L., 2001, Inflammatory mammary carcinoma in dogs: 33 cases (1995-1999). *J Am Vet Med Assoc* 219, 1110-1114.
- Perez-Alenza, M.D., Jimenez, A., Nieto, A.I., Peña, L., 2004, First description of feline inflammatory mammary carcinoma: clinicopathological and immunohistochemical characteristics of three cases. *Breast Cancer Res* 6, R300-307.
- Pérez-Mesa, C., 1967, Pathology of mammary carcinoma. Saunders, Philadelphia.
- Perou, C.M., Sorlie, T., Eisen, M.B., van de Rijn, M., Jeffrey, S.S., Rees, C.A., Pollack, J.R., Ross, D.T., Johnsen, H., Akslen, L.A., Fluge, O., Pergamenschikov, A., Williams, C., Zhu, S.X., Lonning, P.E., Borresen-Dale, A.L., Brown, P.O., Botstein, D., 2000, Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 406, 747-752.
- Pestili de Almeida, E.M., Piche, C., Sirois, J., Dore, M., 2001, Expression of cyclo-oxygenase-2 in naturally occurring squamous cell carcinomas in dogs. *J Histochem Cytochem* 49, 867-875.
- Peters, B.A., Diaz, L.A., Polyak, K., Meszler, L., Romans, K., Guinan, E.C., Antin, J.H., Myerson, D., Hamilton, S.R., Vogelstein, B., Kinzler, K.W., Lengauer, C., 2005, Contribution of bone marrow-derived endothelial cells to human tumor vasculature. *Nat Med* 11, 261-262.
- Peterson, H.I., 1983, Effects of prostaglandin synthesis inhibitors on tumor growth and vascularization. *Experimental studies in the rat. Invasion Metastasis* 3, 151-159.
- Peterson, O.W., Van Deurs, B., 1989, Distinction between vascular smooth muscle cells and myoepithelial cells in primary monolayer culture of human breast tissue. *In Vitro Cell & Dev Biol* 25, 259-266.
- Pezzella, F., Pastorino, U., Tagliabue, E., Andreola, S., Sozzi, G., Gasparini, G., Menard, S., Gatter, K.C., Harris, A.L., Fox, S., Buyse, M., Pilotti, S., Pierotti, M., Rilke, F., 1997, Non-small-cell lung carcinoma tumor growth without morphological evidence of neo-angiogenesis. *Am J Pathol* 151, 1417-1423.
- Piera, J.M., Alonso, M.C., Ojeda, M.B., Biete, A., 1986, Locally advanced breast cancer with inflammatory component: a clinical entity with a poor prognosis. *Radiother Oncol* 7, 199-204.
- Pollock, L., Rampling, D., Greenwald, S.E., Malone, M., 1995, Desmin expression in rhabdomyosarcoma: influence of the desmin clone and immunohistochemical method. *J Clin Pathol* 48, 535-538.
- Popiela, T.J., Sikora, J., Klimek, M., Basta, P., Niemiec, T., Dobrogowski, J., Kotlarz, A., Rudnicka-Sosin, L., Dutsch-Wicherek, M., 2008, The analysis of CD34 antigen immunoreactivity level in invasive ductal breast cancer with respect to the presence of lymph node metastases. *Neuro Endocrinol Lett* 29, 443-446.
- Preziosi, R., Sarli, G., Paltrinieri, M., 2004, Prognostic value of intratumoral vessel density in cutaneous mast cell tumors of the dog. *J Comp Pathol* 130, 143-151.
- Price, D.J., Miralem, T., Jiang, S., Steinberg, R., Avraham, H., 2001, Role of vascular endothelial growth factor in the stimulation of cellular invasion and signaling of breast cancer cells. *Cell Growth Differ* 12, 129-135.
- Prost, S., Le, M.G., Douc-Rasy, S., Ahomadegbe, J.C., Spielmann, M., Guerin, M., Riou, G., 1994, Association of c-erbB2-gene amplification with poor prognosis in non-inflammatory breast carcinomas but not in carcinomas of the inflammatory type. *Int J Cancer* 58, 763-768.
- Queiroga, F.L., Perez-Alenza, M.D., Silvan, G., Peña, L., Lopes, C., Illera, J.C., 2005, Cox-2 levels in canine mammary tumors, including inflammatory mammary carcinoma: clinicopathological features and prognostic significance. *Anticancer Res* 25, 4269-4275.

- Queiroga, F.L., Alves, A., Pires, I., Lopes, C., 2007, Expression of Cox-1 and Cox-2 in canine mammary tumours. *J Comp Pathol* 136, 177-185.
- Queiroga, F.L., Perez-Alenza, M.D., Silvan, G., Peña, L., Lopes, C.S., Illera, J.C., 2008, Crosstalk between GH/IGF-I axis and steroid hormones (progesterone, 17beta-estradiol) in canine mammary tumours. *J Steroid Biochem Mol Biol* 110, 76-82.
- Rabanal, R.M., Else, R.W., 1994, Immunohistochemical localisation of cytokeratin and vimentin intermediate filament proteins in canine mammary tumours. *Res Vet Sci* 56, 225-233.
- Rajantie, I., Ilmonen, M., Alminait, A., Ozerdem, U., Alitalo, K., Salven, P., 2004, Adult bone marrow-derived cells recruited during angiogenesis comprise precursors for periendothelial vascular mural cells. *Blood* 104, 2084-2086.
- Ramaekers, F.C., Haag, D., Kant, A., Moesker, O., Jap, P.H., Vooijs, G.P., 1983, Coexpression of keratin- and vimentin-type intermediate filaments in human metastatic carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80, 2618-2622.
- Ranieri, G., Passantino, L., Patruno, R., Passantino, G., Jirillo, F., Catino, A., Mattioli, V., Gadaleta, C., Ribatti, D., 2003, The dog mast cell tumour as a model to study the relationship between angiogenesis, mast cell density and tumour malignancy. *Oncol Rep* 10, 1189-1193.
- Rasch, C., 1931, Carcinoma erysipeloides. *Br J Derm Syph* 43, 351-354.
- Raymond, W.A., Leong, A.S., 1989, Vimentin--a new prognostic parameter in breast carcinoma? *J Pathol* 158, 107-114.
- Raynaud, J.P., Cotard, M., Andre, F., Mialot, J.P., Rolland, P.H., Martin, P.M., 1981, Spontaneous canine mammary tumour: a model for human endocrine therapy? *J Steroid Biochem* 15, 201-207.
- Resetskova, E., 2008, Pathologic aspects of inflammatory breast carcinoma: part 1. Histomorphology and differential diagnosis. *Semin Oncol* 35, 25-32.
- Restucci, B., De Vico, G., Maiolino, P., 2000, Evaluation of angiogenesis in canine mammary tumors by quantitative platelet endothelial cell adhesion molecule immunohistochemistry. *Vet Pathol* 37, 297-301.
- Restucci, B., Papparella, S., Maiolino, P., De Vico, G., 2002, Expression of vascular endothelial growth factor in canine mammary tumors. *Vet Pathol* 39, 488-493.
- Restucci, B., Borzacchiello, G., Maiolino, P., Martano, M., Paciello, O., Papparella, S., 2004, Expression of vascular endothelial growth factor receptor Flk-1 in canine mammary tumours. *J Comp Pathol* 130, 99-104.
- Reyes, M., Dudek, A., Jahagirdar, B., Koodie, L., Marker, P.H., Verfaillie, C.M., 2002, Origin of endothelial progenitors in human postnatal bone marrow. *J Clin Invest* 109, 337-346.
- Riou, G., Le, M.G., Travagli, J.P., Levine, A.J., Moll, U.M., 1993, Poor prognosis of p53 gene mutation and nuclear overexpression of p53 protein in inflammatory breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 85, 1765-1767.
- Ristimaki, A., Sivula, A., Lundin, J., Lundin, M., Salminen, T., Haglund, C., Joensuu, H., Isola, J., 2002, Prognostic significance of elevated cyclooxygenase-2 expression in breast cancer. *Cancer Res* 62, 632-635.
- Rodeghiero, F., 2002, von Willebrand disease: still an intriguing disorder in the era of molecular medicine. *Haemophilia* 8, 292-300.
- Rogers, C.S., Fitts, W.T., Jr., 1956, Inflammatory carcinoma of the breast: a critique of therapy. *Surgery* 39, 367-370.

- Rolland, P.H., Martin, P.M., Jacquemier, J., Rolland, A.M., Toga, M., 1980, Prostaglandin in human breast cancer: Evidence suggesting that an elevated prostaglandin production is a marker of high metastatic potential for neoplastic cells. *J Natl Cancer Inst* 64, 1061-1070.
- Rosen, P.P., 1996, *Rosen's Breast Pathology* Philadelphia.
- Rozic, J.G., Chakraborty, C., Lala, P.K., 2001, Cyclooxygenase inhibitors retard murine mammary tumor progression by reducing tumor cell migration, invasiveness and angiogenesis. *Int J Cancer* 93, 497-506.
- Rubanyi, G.M., Johns, A., Kauser, K., 2002, Effect of estrogen on endothelial function and angiogenesis. *Vascul Pharmacol* 38, 89-98.
- Ruggeri, Z.M., Ware, J., 1993, von Willebrand factor. *FASEB J* 7, 308-316.
- Ruiz Simón, A., Climent, M.A., Lluch, A., Lombart, A., Moya, V., Fernandez-Martos, C., Guillén, V., 2000, Inflammatory Breast Carcinoma: pathological or clinical entity? *Breast Cancer Res and Treat* 64, 269-273.
- Ruohola, J.K., Valve, E.M., Karkkainen, M.J., Joukov, V., Alitalo, K., Harkonen, P.L., 1999, Vascular endothelial growth factors are differentially regulated by steroid hormones and antiestrogens in breast cancer cells. *Mol Cell Endocrinol* 149, 29-40.
- Rutteman, G.R., 1990, Hormones and mammary tumour disease in the female dog: an update. *In Vivo* 4, 33-40.
- Ryden, L., Linderholm, B., Nielsen, N.H., Emdin, S., Jonsson, P.E., Landberg, G., 2003, Tumor specific VEGF-A and VEGFR2/KDR protein are co-expressed in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 82, 147-154.
- Ryden, L., Stendahl, M., Jonsson, H., Emdin, S., Bengtsson, N.O., Landberg, G., 2005, Tumor-specific VEGF-A and VEGFR2 in postmenopausal breast cancer patients with long-term follow-up. Implication of a link between VEGF pathway and tamoxifen response. *Breast Cancer Res Treat* 89, 135-143.
- Sabate, J.M., Gomez, A., Torrubia, S., Camins, A., Roson, N., De Las Heras, P., Villalba-Nuno, V., 2002, Lymphoma of the breast: clinical and radiologic features with pathologic correlation in 28 patients. *Breast J* 8, 294-304.
- Saharinen, P., Tammela, T., Karkkainen, M.J., Alitalo, K., 2004, Lymphatic vasculature: development, molecular regulation and role in tumor metastasis and inflammation. *Trends Immunol* 25, 387-395.
- Saltzstein, S.L., 1974, Clinically occult inflammatory carcinoma of the breast. *Cancer* 34, 382-388.
- Salven, P., Lymboussaki, A., Heikkila, P., Jaaskela-Saari, H., Enholm, B., Aase, K., von Euler, G., Eriksson, U., Alitalo, K., Joensuu, H., 1998, Vascular endothelial growth factors VEGF-B and VEGF-C are expressed in human tumors. *Am J Pathol* 153, 103-108.
- Sanchez-Archidona, A.R., Jimenez, M.A., Perez-Alenza, D., Silvan, G., Illera, J.C., Peña, L., Dunner, S., 2007, Steroid pathway and oestrone sulphate production in canine inflammatory mammary carcinoma. *J Steroid Biochem Mol Biol* 104, 93-99.
- Sarli, G., Sassi, F., Brunetti, B., Rizzo, A., Diracca, L., Benazzi, C., 2007, Lymphatic vessels assessment in feline mammary tumours. *BMC Cancer* 7, 7.
- Sartin, E.A., Barnes, S., Kwapien, R.P., Wolfe, L.G., 1992, Estrogen and progesterone receptor status of mammary carcinomas and correlation with clinical outcome in dogs. *Am J Vet Res* 53, 2196-2200.

- Sawano, A., Takahashi, T., Yamaguchi, S., Aonuma, M., Shibuya, M., 1996, Flt-1 but not KDR/Flk-1 tyrosine kinase is a receptor for placenta growth factor, which is related to vascular endothelial growth factor. *Cell Growth Differ* 7, 213-221.
- Sawaoka, H., Tsuji, S., Tsujii, M., Gunawan, E.S., Sasaki, Y., Kawano, S., Hori, M., 1999, Cyclooxygenase inhibitors suppress angiogenesis and reduce tumor growth in vivo. *Lab Invest* 79, 1469-1477.
- Saxena, S., Beena, K.R., Bansal, A., Bhatnagar, A., 2002, Emperipolesis in a common breast malignancy. A case report. *Acta Cytol* 46, 883-886.
- Schlingemann, R.O., Rietveld, F.J., de Waal, R.M., Bradley, N.J., Skene, A.I., Davies, A.J., Greaves, M.F., Denekamp, J., Ruiter, D.J., 1990, Leukocyte antigen CD34 is expressed by a subset of cultured endothelial cells and on endothelial abluminal microprocesses in the tumor stroma. *Lab Invest* 62, 690-696.
- Schoppmann, S.F., Birner, P., Studer, P., Breiteneder-Geleff, S., 2001, Lymphatic microvessel density and lymphovascular invasion assessed by anti-podoplanin immunostaining in human breast cancer. *Anticancer Res* 21, 2351-2355.
- Schoppmann, S.F., Bayer, G., Aumayr, K., Taucher, S., Geleff, S., Rudas, M., Kubista, E., Hausmaninger, H., Samonigg, H., Gnant, M., Jakesz, R., Horvat, R., 2004, Prognostic value of lymphangiogenesis and lymphovascular invasion in invasive breast cancer. *Ann Surg* 240, 306-312.
- Schumann, E.A., 1911, V. A Study of Carcinoma Mastitoides. *Ann Surg* 54, 69-77.
- Seemayer, T.A., Lagace, R., Schurch, W., Tremblay, G., 1979, Myofibroblasts in the stroma of invasive and metastatic carcinoma: a possible host response to neoplasia. *Am J Surg Pathol* 3, 525-533.
- SEER 2005. Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) Program, Public-Use Database (1973-2002), N.C.I., DCCPS, Surveillance Research Program, Cancer Statistics Branch, ed. (National Cancer Institute), p. www.seer.cancer.gov.
- Seftor, R.E., Seftor, E.A., Koshikawa, N., Meltzer, P.S., Gardner, L.M., Bilban, M., Stetler-Stevenson, W.G., Quaranta, V., Hendrix, M.J., 2001, Cooperative interactions of laminin 5 gamma2 chain, matrix metalloproteinase-2, and membrane type-1-matrix/metalloproteinase are required for mimicry of embryonic vasculogenesis by aggressive melanoma. *Cancer Res* 61, 6322-6327.
- Seftor, R.E., Seftor, E.A., Kirschmann, D.A., Hendrix, M.J., 2002, Targeting the tumor microenvironment with chemically modified tetracyclines: inhibition of laminin 5 gamma2 chain promigratory fragments and vasculogenic mimicry. *Mol Cancer Ther* 1, 1173-1179.
- Selim, A.G., El-Ayat, G., Wells, C.A., 2002, Androgen receptor expression in ductal carcinoma in situ of the breast: relation to oestrogen and progesterone receptors. *J Clin Pathol* 55, 14-16.
- Seshadri, R., Raymond, W.A., Leong, A.S., Horsfall, D.J., McCaul, K., 1996, Vimentin expression is not associated with poor prognosis in breast cancer. *Int J Cancer* 67, 353-356.
- Shamoto, M., 1981, Emperipolesis of hematopoietic cells in myelocytic leukemia. Electron microscopic and phase contrast microscopic studies. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 35, 283-290.
- Sharma, N., Seftor, R.E., Seftor, E.A., Gruman, L.M., Heidger, P.M., Jr., Cohen, M.B., Lubaroff, D.M., Hendrix, M.J., 2002, Prostatic tumor cell plasticity involves cooperative interactions of distinct phenotypic subpopulations: role in vasculogenic mimicry. *Prostate* 50, 189-201.
- Sherry, M.M., Johnson, D.H., Page, D.L., Greco, F.A., Hainsworth, J.D., 1985, Inflammatory carcinoma of the breast. Clinical review and summary of the Vanderbilt experience with multi-modality therapy. *Am J Med* 79, 355-364.
- Shi, P., Wang, M., Zhang, Q., Sun, J., 2008, Lipid-rich carcinoma of the breast. A clinicopathological study of 49 cases. *Tumori* 94, 342-346.

- Shirakawa, K., Tsuda, H., Heike, Y., Kato, K., Asada, R., Inomata, M., Sasaki, H., Kasumi, F., Yoshimoto, M., Iwanaga, T., Konishi, F., Terada, M., Wakasugi, H., 2001, Absence of endothelial cells, central necrosis, and fibrosis are associated with aggressive inflammatory breast cancer. *Cancer Res* 61, 445-451.
- Shirakawa, K., Furuhata, S., Watanabe, I., Hayase, H., Shimizu, A., Ikarashi, Y., Yoshida, T., Terada, M., Hashimoto, D., Wakasugi, H., 2002a, Induction of vasculogenesis in breast cancer models. *Br J Cancer* 87, 1454-1461.
- Shirakawa, K., Kobayashi, H., Heike, Y., Kawamoto, S., Brechbiel, M.W., Kasumi, F., Iwanaga, T., Konishi, F., Terada, M., Wakasugi, H., 2002b, Hemodynamics in vasculogenic mimicry and angiogenesis of inflammatory breast cancer xenograft. *Cancer Res* 62, 560-566.
- Shirakawa, K., Shibuya, M., Heike, Y., Takashima, S., Watanabe, I., Konishi, F., Kasumi, F., Goldman, C.K., Thomas, K.A., Bett, A., Terada, M., Wakasugi, H., 2002c, Tumor-infiltrating endothelial cells and endothelial precursor cells in inflammatory breast cancer. *Int J Cancer* 99, 344-351.
- Shirakawa, K., Wakasugi, H., Heike, Y., Watanabe, I., Yamada, S., Saito, K., Konishi, F., 2002d, Vasculogenic mimicry and pseudo-comedo formation in breast cancer. *Int J Cancer* 99, 821-828.
- Shirakawa, K., Kobayashi, H., Sobajima, J., Hashimoto, D., Shimizu, A., Wakasugi, H., 2003, Inflammatory breast cancer: vasculogenic mimicry and its hemodynamics of an inflammatory breast cancer xenograft model. *Breast Cancer Res* 5, 136-139.
- Siitonen, S.M., Haapasalo, H.K., Rantala, I.S., Helin, H.J., Isola, J.J., 1995, Comparison of different immunohistochemical methods in the assessment of angiogenesis: lack of prognostic value in a group of 77 selected node-negative breast carcinomas. *Mod Pathol* 8, 745-752.
- Silvan, G., Illera, J.C., Pérez-Alenza, M.D., al., E., 2003. The possible role of IGF-I and estrogens in the development of canine inflammatory mammary carcinoma. In: XXXIII Congress of SSPS.
- Silvestre, J.S., Tamarat, R., Ebrahimian, T.G., Le-Roux, A., Clergue, M., Emmanuel, F., Duriez, M., Schwartz, B., Branellec, D., Levy, B.I., 2003, Vascular endothelial growth factor-B promotes in vivo angiogenesis. *Circ Res* 93, 114-123.
- Simpson, J.F., Ahn, C., Battifora, H., Esteban, J.M., 1996, Endothelial area as a prognostic indicator for invasive breast carcinoma. *Cancer* 77, 2077-2085.
- Singh, B., Lucci, A., 2002, Role of cyclooxygenase-2 in breast cancer. *J Surg Res* 108, 173-179.
- Singh, B., Berry, J.A., Shoher, A., Ramakrishnan, V., Lucci, A., 2005, COX-2 overexpression increases motility and invasion of breast cancer cells. *Int J Oncol* 26, 1393-1399.
- Singletary, S.E., Allred, C., Ashley, P., Bassett, L.W., Berry, D., Bland, K.I., Borgen, P.I., Clark, G., Edge, S.B., Hayes, D.F., Hughes, L.L., Hutter, R.V., Morrow, M., Page, D.L., Recht, A., Theriault, R.L., Thor, A., Weaver, D.L., Wieand, H.S., Greene, F.L., 2002, Revision of the American Joint Committee on Cancer staging system for breast cancer. *J Clin Oncol* 20, 3628-3636.
- Singletary, S.E., Cristofanilli, M., 2008, Defining the clinical diagnosis of inflammatory breast cancer. *Semin Oncol* 35, 7-10.
- Skalli, O., Ropraz, P., Trzeciak, A., Benzouana, G., Gillesse, D., Gabbiani, G., 1986, A monoclonal antibody against alpha-smooth muscle actin: a new probe for smooth muscle differentiation. *J Cell Biol* 103, 2787-2796.
- Skobe, M., Hawighorst, T., Jackson, D.G., Prevo, R., Janes, L., Velasco, P., Riccardi, L., Alitalo, K., Claffey, K., Detmar, M., 2001, Induction of tumor lymphangiogenesis by VEGF-C promotes breast cancer metastasis. *Nat Med* 7, 192-198.

- Sledge, G.W., Jr., Miller, K.D., 2003, Exploiting the hallmarks of cancer: the future conquest of breast cancer. *Eur J Cancer* 39, 1668-1675.
- Sobin, L.H., Wittekind, C., 2002, TNM classification of malignant tumours, 6th ed. / edited by L.H. Sobin and Ch. Wittekind. Edition. Wiley-Liss, New York ; [Chichester], xxiii, 239 p. pp.
- Sood, A.K., Seftor, E.A., Fletcher, M.S., Gardner, L.M., Heidger, P.M., Buller, R.E., Seftor, R.E., Hendrix, M.J., 2001, Molecular determinants of ovarian cancer plasticity. *Am J Pathol* 158, 1279-1288.
- Sood, A.K., Fletcher, M.S., Coffin, J.E., Yang, M., Seftor, E.A., Gruman, L.M., Gershenson, D.M., Hendrix, M.J., 2004, Functional role of matrix metalloproteinases in ovarian tumor cell plasticity. *Am J Obstet Gynecol* 190, 899-909.
- Speirs, V., Atkin, S.L., 1999, Production of VEGF and expression of the VEGF receptors Flt-1 and KDR in primary cultures of epithelial and stromal cells derived from breast tumours. *Br J Cancer* 80, 898-903.
- Spicer, D.V., Pike, M.C., 1994, Sex steroids and breast cancer prevention. *J Natl Cancer Inst Monogr*, 139-147.
- Spizzo, G., Gastl, G., Wolf, D., Gunsilius, E., Steurer, M., Fong, D., Amberger, A., Margreiter, R., Obrist, P., 2003, Correlation of COX-2 and Ep-CAM overexpression in human invasive breast cancer and its impact on survival. *Br J Cancer* 88, 574-578.
- Sproul cited by Haagensen, C.D., 1971, The natural history of breast carcinoma, 2nd Edition Philadelphia.
- Stacker, S.A., Stenvers, K., Caesar, C., Vitali, A., Domagala, T., Nice, E., Roufail, S., Simpson, R.J., Moritz, R., Karpanen, T., Alitalo, K., Achen, M.G., 1999, Biosynthesis of vascular endothelial growth factor-D involves proteolytic processing which generates non-covalent homodimers. *J Biol Chem* 274, 32127-32136.
- Stacker, S.A., Caesar, C., Baldwin, M.E., Thornton, G.E., Williams, R.A., Prevo, R., Jackson, D.G., Nishikawa, S., Kubo, H., Achen, M.G., 2001, VEGF-D promotes the metastatic spread of tumor cells via the lymphatics. *Nat Med* 7, 186-191.
- Stevens, A., Lowe, J., 1992, Histology. Londres.
- Stockhaus, C., Kohn, B., Rudolph, R., Brunnberg, L., Giger, U., 1999, Correlation of haemostatic abnormalities with tumour stage and characteristics in dogs with mammary carcinoma. *J Small Anim Pract* 40, 326-331.
- Stoner, M., Wormke, M., Saville, B., Samudio, I., Qin, C., Abdelrahim, M., Safe, S., 2004, Estrogen regulation of vascular endothelial growth factor gene expression in ZR-75 breast cancer cells through interaction of estrogen receptor alpha and SP proteins. *Oncogene* 23, 1052-1063.
- Stuart-Harris, R., Caldas, C., Pinder, S.E., Pharoah, P., 2008, Proliferation markers and survival in early breast cancer: a systematic review and meta-analysis of 85 studies in 32,825 patients. *Breast* 17, 323-334.
- Sullivan, C.A., Ghosh, S., Ocal, I.T., Camp, R.L., Rimm, D.L., Chung, G.G., 2008, Microvessel area using automated image analysis is reproducible and is associated with prognosis in breast cancer. *Hum Pathol*.
- Sun, B., Zhang, S., Zhao, X., Zhang, W., Hao, X., 2004, Vasculogenic mimicry is associated with poor survival in patients with mesothelial sarcomas and alveolar rhabdomyosarcomas. *Int J Oncol* 25, 1609-1614.
- Surowiak, P., Suchocki, S., Gyorffy, B., Gansukh, T., Wojnar, A., Maciejczyk, A., Pudelko, M., Zabel, M., 2006, Stromal myofibroblasts in breast cancer: relations between their occurrence, tumor grade and expression of some tumour markers. *Folia Histochem Cytobiol* 44, 111-116.

- Surowiak, P., Murawa, D., Materna, V., Maciejczyk, A., Pudelko, M., Ciesla, S., Breborowicz, J., Murawa, P., Zabel, M., Dietel, M., Lage, H., 2007, Occurrence of stromal myofibroblasts in the invasive ductal breast cancer tissue is an unfavourable prognostic factor. *Anticancer Res* 27, 2917-2924.
- Susaneck, S.J., Allen, T.A., Hoopes, J., Withrow, S.J., Macy, D.W., 1983, Inflammatory mammary carcinoma in the dog. *J Am Anim Hosp Assoc* 9, 971-976.
- Swain, S.M., Lippman, M.E., 1989, Treatment of patients with inflammatory breast cancer. *Important Adv Oncol*, 129-150.
- Swanson, C.A., Brinton, L.A., Taylor, P.R., Licitra, L.M., Ziegler, R.G., Schairer, C., 1989, Body size and breast cancer risk assessed in women participating in the Breast Cancer Detection Demonstration Project. *Am J Epidemiol* 130, 1133-1141.
- Tabbane, F., Muenz, L., Jaziri, M., Cammoun, M., Belhassen, S., Mourali, N., 1977, Clinical and prognostic features of a rapidly progressing breast cancer in Tunisia. *Cancer* 40, 376-382.
- Taketo, M.M., 1998, Cyclooxygenase-2 inhibitors in tumorigenesis (Part II). *J Natl Cancer Inst* 90, 1609-1620.
- Tardivon, A.A., Viala, J., Corvellec Rudelli, A., Guinebretiere, J.M., Vanel, D., 1997, Mammographic patterns of inflammatory breast carcinoma: a retrospective study of 92 cases. *Eur J Radiol* 24, 124-130.
- Tavassoli, F.A., 1999, *Inflammatory Carcinoma, Infiltrating Carcinomas: Special Types.*, 2nd Edition New York.
- Taylor, G., Meltzer, 1938, Inflammatory carcinoma of the breast. *Am J Cancer*. 33, 33-49.
- Therasse, P., Mauriac, L., Welnicka-Jaskiewicz, M., Bruning, P., Cufer, T., Bonnefoi, H., Tomiak, E., Pritchard, K.I., Hamilton, A., Piccart, M.J., 2003, Final results of a randomized phase III trial comparing cyclophosphamide, epirubicin, and fluorouracil with a dose-intensified epirubicin and cyclophosphamide + filgrastim as neoadjuvant treatment in locally advanced breast cancer: an EORTC-NCIC-SAKK multicenter study. *J Clin Oncol* 21, 843-850.
- Thies, A., Mangold, U., Moll, I., Schumacher, U., 2001, PAS-positive loops and networks as a prognostic indicator in cutaneous malignant melanoma. *J Pathol* 195, 537-542.
- Thijssen, J.H., Blankenstein, M.A., Donker, G.H., Daroszewski, J., 1991, Endogenous steroid hormones and local aromatase activity in the breast. *J Steroid Biochem Mol Biol* 39, 799-804.
- Thomas, P.A., Kirschmann, D.A., Cerhan, J.R., Folberg, R., Seftor, E.A., Sellers, T.A., Hendrix, M.J., 1999, Association between keratin and vimentin expression, malignant phenotype, and survival in postmenopausal breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 5, 2698-2703.
- Timoshenko, A.V., Xu, G., Chakrabarti, S., Lala, P.K., Chakraborty, C., 2003, Role of prostaglandin E2 receptors in migration of murine and human breast cancer cells. *Exp Cell Res* 289, 265-274.
- Timoshenko, A.V., Chakraborty, C., Wagner, G.F., Lala, P.K., 2006, COX-2-mediated stimulation of the lymphangiogenic factor VEGF-C in human breast cancer. *Br J Cancer* 94, 1154-1163.
- Toi, M., Kashitani, J., Tominaga, T., 1993, Tumor angiogenesis is an independent prognostic indicator in primary breast carcinoma. *Int J Cancer* 55, 371-374.
- Toi, M., Inada, K., Hoshina, S., Suzuki, H., Kondo, S., Tominaga, T., 1995, Vascular endothelial growth factor and platelet-derived endothelial cell growth factor are frequently coexpressed in highly vascularized human breast cancer. *Clin Cancer Res* 1, 961-964.
- Traweek, S.T., Kandalaft, P.L., Mehta, P., Battifora, H., 1991, The human hematopoietic progenitor cell antigen (CD34) in vascular neoplasia. *Am J Clin Pathol* 96, 25-31.

- Tremblay, G., 1979, Stromal aspects of breast carcinoma. *Exp Mol Pathol* 31, 248-260.
- Tremblay, C., Dore, M., Bochsler, P.N., Sirois, J., 1999, Induction of prostaglandin G/H synthase-2 in a canine model of spontaneous prostatic adenocarcinoma. *J Natl Cancer Inst* 91, 1398-1403.
- Treves, N., 1953, Inflammatory carcinoma of the breast in the male patient. *Surgery* 34, 810-820.
- Tsubura, A., Hatano, T., Murata, A., Shoji, T., Shikata, N., Morii, S., 1991, Breast carcinoma in patients receiving neuroleptic therapy. Morphologic and clinico-pathologic features of thirteen cases. *Acta Pathol Japon* 7, 494-499.
- Tsujii, M., DuBois, R.N., 1995, Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase 2. *Cell* 83, 493-501.
- Tsujii, M., Kawano, S., DuBois, R.N., 1997, Cyclooxygenase-2 expression in human colon cancer cells increases metastatic potential. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 3336-3340.
- Tsujii, M., Kawano, S., Tsuji, S., Sawaoka, H., Hori, M., DuBois, R.N., 1998, Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. *Cell* 93, 705-716.
- Tsutsui, S., Kume, M., Era, S., 2003, Prognostic value of microvessel density in invasive ductal carcinoma of the breast. *Breast Cancer* 10, 312-319.
- Ueda, M., Terai, Y., Yamashita, Y., Kumagai, K., Ueki, K., Yamaguchi, H., Akise, D., Hung, Y.C., Ueki, M., 2002, Correlation between vascular endothelial growth factor-C expression and invasion phenotype in cervical carcinomas. *Int J Cancer* 98, 335-343.
- Ueno, N.T., Buzdar, A.U., Singletary, S.E., Ames, F.C., McNeese, M.D., Holmes, F.A., Theriault, R.L., Strom, E.A., Wasaff, B.J., Asmar, L., Frye, D., Hortobagyi, G.N., 1997, Combined-modality treatment of inflammatory breast carcinoma: twenty years of experience at M. D. Anderson Cancer Center. *Cancer Chemother Pharmacol* 40, 321-329.
- Ueno, T., Chow, L.W., Toi, M., 2006, Increases in circulating VEGF levels during COX-2 inhibitor treatment in breast cancer patients. *Biomed Pharmacother* 60, 277-279.
- Uzzan, B., Nicolas, P., Cucherat, M., Perret, G.Y., 2004, Microvessel density as a prognostic factor in women with breast cancer: a systematic review of the literature and meta-analysis. *Cancer Res* 64, 2941-2955.
- Vail, D.M., MacEwen, E.G., 2000, Spontaneously occurring tumors of companion animals as models for human cancer. *Cancer Invest* 18, 781-792.
- Valkovic, T., Dobrila, F., Melato, M., Sasso, F., Rizzardi, C., Jonjic, N., 2002, Correlation between vascular endothelial growth factor, angiogenesis, and tumor-associated macrophages in invasive ductal breast carcinoma. *Virchows Arch* 440, 583-588.
- Valtola, R., Salven, P., Heikkila, P., Taipale, J., Joensuu, H., Rehn, M., Pihlajaniemi, T., Weich, H., deWaal, R., Alitalo, K., 1999, VEGFR-3 and its ligand VEGF-C are associated with angiogenesis in breast cancer. *Am J Pathol* 154, 1381-1390.
- Van der Auwera, I., Van Laere, S.J., Van den Eynden, G.G., Benoy, I., van Dam, P., Colpaert, C.G., Fox, S.B., Turley, H., Harris, A.L., Van Marck, E.A., Vermeulen, P.B., Dirix, L.Y., 2004, Increased angiogenesis and lymphangiogenesis in inflammatory versus noninflammatory breast cancer by real-time reverse transcriptase-PCR gene expression quantification. *Clin Cancer Res* 10, 7965-7971.
- Van der Auwera, I., Van den Eynden, G.G., Colpaert, C.G., Van Laere, S.J., van Dam, P., Van Marck, E.A., Dirix, L.Y., Vermeulen, P.B., 2005, Tumor lymphangiogenesis in inflammatory breast carcinoma: a histomorphometric study. *Clin Cancer Res* 11, 7637-7642.

- Van der Auwera, I., Cao, Y., Tille, J.C., Pepper, M.S., Jackson, D.G., Fox, S.B., Harris, A.L., Dirix, L.Y., Vermeulen, P.B., 2006, First international consensus on the methodology of lymphangiogenesis quantification in solid human tumours. *Br J Cancer* 95, 1611-1625.
- van der Schaft, D.W., Hillen, F., Pauwels, P., Kirschmann, D.A., Castermans, K., Egbrink, M.G., Tran, M.G., Sciort, R., Hauben, E., Hogendoorn, P.C., Delattre, O., Maxwell, P.H., Hendrix, M.J., Griffioen, A.W., 2005, Tumor cell plasticity in Ewing sarcoma, an alternative circulatory system stimulated by hypoxia. *Cancer Res* 65, 11520-11528.
- van der Schaft, D.W., Pauwels, P., Hulsmans, S., Zimmermann, M., van de Poll-Franse, L.V., Griffioen, A.W., 2007, Absence of lymphangiogenesis in ductal breast cancer at the primary tumor site. *Cancer Lett* 254, 128-136.
- van Golen, K.L., Davies, S., Wu, Z.F., Wang, Y., Bucana, C.D., Root, H., Chandrasekharappa, S., Strawderman, M., Ethier, S.P., Merajver, S.D., 1999, A novel putative low-affinity insulin-like growth factor-binding protein, LIBC (lost in inflammatory breast cancer), and RhoC GTPase correlate with the inflammatory breast cancer phenotype. *Clin Cancer Res* 5, 2511-2519.
- van Golen, K.L., Wu, Z.F., Qiao, X.T., Bao, L.W., Merajver, S.D., 2000a, RhoC GTPase, a novel transforming oncogene for human mammary epithelial cells that partially recapitulates the inflammatory breast cancer phenotype. *Cancer Res* 60, 5832-5838.
- van Golen, K.L., Wu, Z.F., Qiao, X.T., Bao, L., Merajver, S.D., 2000b, RhoC GTPase overexpression modulates induction of angiogenic factors in breast cells. *Neoplasia* 2, 418-425.
- Van Hoef, M.E., Knox, W.F., Dhesi, S.S., Howell, A., Schor, A.M., 1993, Assessment of tumour vascularity as a prognostic factor in lymph node negative invasive breast cancer. *Eur J Cancer* 29A, 1141-1145.
- Vermeulen, A., Deslypere, J.P., Paridaens, R., 1986, Steroid dynamics in the normal and carcinomatous mammary gland. *J Steroid Biochem* 25, 799-802.
- Vermeulen, P.B., Gasparini, G., Fox, S.B., Toi, M., Martin, L., McCulloch, P., Pezzella, F., Viale, G., Weidner, N., Harris, A.L., Dirix, L.Y., 1996, Quantification of angiogenesis in solid human tumours: an international consensus on the methodology and criteria of evaluation. *Eur J Cancer* 32A, 2474-2484.
- Vermeulen, P.B., Gasparini, G., Fox, S.B., Colpaert, C., Marson, L.P., Gion, M., Belien, J.A., de Waal, R.M., Van Marck, E., Magnani, E., Weidner, N., Harris, A.L., Dirix, L.Y., 2002, Second international consensus on the methodology and criteria of evaluation of angiogenesis quantification in solid human tumours. *Eur J Cancer* 38, 1564-1579.
- Veyret, C., Levy, C., Chollet, P., Merrouche, Y., Roche, H., Kerbrat, P., Fumoleau, P., Fargeot, P., Clavere, P., Chevallier, B., 2006, Inflammatory breast cancer outcome with epirubicin-based induction and maintenance chemotherapy: ten-year results from the French Adjuvant Study Group GETIS 02 Trial. *Cancer* 107, 2535-2544.
- Viadana, E., Cotter, R., Pickren, J.W., Bross, I.D., 1973, An autopsy study of metastatic sites of breast cancer. *Cancer Res* 33, 179-181.
- Viale, G., Giobbie-Hurder, A., Regan, M.M., Coates, A.S., Mastropasqua, M.G., Dell'orto, P., Maiorano, E., Macgrogan, G., Braye, S.G., Ohlschlegel, C., Neven, P., Orosz, Z., Olszewski, W.P., Knox, F., Thurlimann, B., Price, K.N., Castiglione-Gertsch, M., Gelber, R.D., Gusterson, B.A., Goldhirsch, A., 2008, Prognostic and Predictive Value of Centrally Reviewed Ki-67 Labeling Index in Postmenopausal Women With Endocrine-Responsive Breast Cancer: Results From Breast International Group Trial 1-98 Comparing Adjuvant Tamoxifen With Letrozole. *J Clin Oncol*.
- Visser, D.W., Smilantetz, S., Drozdowicz, S., Wykes, S.M., 1993, Prognostic significance of image morphometric microvessel enumeration in breast carcinoma. *Anal Quant Cytol Histol* 15, 88-92.

- Vleugel, M.M., Bos, R., van der Groep, P., Greijer, A.E., Shvarts, A., Stel, H.V., van der Wall, E., van Diest, P.J., 2004, Lack of lymphangiogenesis during breast carcinogenesis. *J Clin Pathol* 57, 746-751.
- von Beust, B.R., Suter, M.M., Summers, B.A., 1988, Factor VIII-related antigen in canine endothelial neoplasms: an immunohistochemical study. *Vet Pathol* 25, 251-255.
- Von Volkmann, R., Brust, K., 1875, Beitrage zur chirurgie. Breitkopf und Hartel, 319-334 pp.
- Vos, J.H., van den Ingh, T.S., Misdorp, W., Molenbeek, R.F., van Mil, F.N., Rutteman, G.R., Ivanyi, D., Ramaekers, F.C., 1993a, Immunohistochemistry with keratin, vimentin, desmin, and alpha-smooth muscle actin monoclonal antibodies in canine mammary gland: benign mammary tumours and duct ectasias. *Vet Q* 15, 89-95.
- Vos, J.H., van den Ingh, T.S., Misdorp, W., Molenbeek, R.F., van Mil, F.N., Rutteman, G.R., Ivanyi, D., Ramaekers, F.C., 1993b, Immunohistochemistry with keratin, vimentin, desmin, and alpha-smooth muscle actin monoclonal antibodies in canine mammary gland: malignant mammary tumours. *Vet Q* 15, 96-102.
- Wada, T., Yasutomi, M., Hashmura, K., Kunikata, M., Tanaka, T., Mori, M., 1992, Vimentin expression in benign and malignant lesions in the human mammary gland. *Anticancer Res* 12, 1973-1982.
- Wakui, S., Muto, T., Yokoo, K., Yokoo, R., Takahashi, H., Masaoka, T., Hano, H., Furusato, M., 2001, Prognostic status of p53 gene mutation in canine mammary carcinoma. *Anticancer Res* 21, 611-616.
- Walshe, J.M., Swain, S.M., 2005, Clinical aspects of inflammatory breast cancer. *Breast Dis* 22, 35-44.
- Warso, M.A., Maniotis, A.J., Chen, X., Majumdar, D., Patel, M.K., Shilkaitis, A., Gupta, T.K., Folberg, R., 2001, Prognostic significance of periodic acid-Schiff-positive patterns in primary cutaneous melanoma. *Clin Cancer Res* 7, 473-477.
- Weibel, E.R., Palade, G.E., 1964, New Cytoplasmic Components in Arterial Endothelia. *J Cell Biol* 23, 101-112.
- Weidner, N., Semple, J.P., Welch, W.R., Folkman, J., 1991, Tumor angiogenesis and metastasis--correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med* 324, 1-8.
- Weidner, N., Folkman, J., Pozza, F., Bevilacqua, P., Allred, E.N., Moore, D.H., Meli, S., Gasparini, G., 1992, Tumor angiogenesis: a new significant and independent prognostic indicator in early-stage breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 84, 1875-1887.
- Weigelt, B., Peterse, J.L., van 't Veer, L.J., 2005, Breast cancer metastasis: markers and models. *Nat Rev Cancer* 5, 591-602.
- Wesseling, P., van der Laak, J.A., de Leeuw, H., Ruiter, D.J., Burger, P.C., 1994, Quantitative immunohistological analysis of the microvasculature in untreated human glioblastoma multiforme. Computer-assisted image analysis of whole-tumor sections. *J Neurosurg* 81, 902-909.
- Wigle, J.T., Oliver, G., 1999, Prox1 function is required for the development of the murine lymphatic system. *Cell* 98, 769-778.
- Wiley, H.E., Gonzalez, E.B., Maki, W., Wu, M.T., Hwang, S.T., 2001, Expression of CC chemokine receptor-7 and regional lymph node metastasis of B16 murine melanoma. *J Natl Cancer Inst* 93, 1638-1643.
- Wilke, D., Colwell, B., Dewar, R., 1998, Inflammatory breast carcinoma: comparison of survival of those diagnosed clinically, pathologically, or with both features. *Am Surg* 64, 428-431.
- Wilson, J.E., Chandrasekharan, N.V., Westover, K.D., Eager, K.B., Simmons, D.L., 2004, Determination of expression of cyclooxygenase-1 and -2 isozymes in canine tissues and their differential sensitivity to nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Am J Vet Res* 65, 810-818.

- Williams, C.S., DuBois, R.N., 1996, Prostaglandin endoperoxide synthase: why two isoforms? *Am J Physiol* 270, G393-400.
- Wingo, P.A., Jamison, P.M., Young, J.L., Gargiullo, P., 2004, Population-based statistics for women diagnosed with inflammatory breast cancer (United States). *Cancer Causes Control* 15, 321-328.
- Withrow, S.J., Vail, D.M., 2007, *Withrow & MacEwen's small animal clinical oncology*, 4th ed. / edited by Stephen J. Withrow and David M. Vail. Edition. Saunders Elsevier, St. Louis, Mo., xvii, 846 p. pp.
- Woodward, W.A. and Buchholz, T.A., 2008, The role of locoregional therapy in inflammatory breast cancer. *Semin Oncol* 35, 78-86.
- Wu, J., Richer, J., Horwitz, K.B., Hyder, S.M., 2004, Progesterin-dependent induction of vascular endothelial growth factor in human breast cancer cells: preferential regulation by progesterone receptor B. *Cancer Res* 64, 2238-2244.
- Wulfing, P., Diallo, R., Muller, C., Wulfing, C., Poremba, C., Heinecke, A., Rody, A., Greb, R.R., Bocker, W., Kiesel, L., 2003, Analysis of cyclooxygenase-2 expression in human breast cancer: high throughput tissue microarray analysis. *J Cancer Res Clin Oncol* 129, 375-382.
- Xie, K., Wei, D., Shi, Q., Huang, S., 2004, Constitutive and inducible expression and regulation of vascular endothelial growth factor. *Cytokine Growth Factor Rev* 15, 297-324.
- Yamada, M., Kawai, M., Kawai, Y., Mashima, Y., 1999, The effect of selective cyclooxygenase-2 inhibitor on corneal angiogenesis in the rat. *Curr Eye Res* 19, 300-304.
- Yamada, Y., Nezu, J., Shimane, M., Hirata, Y., 1997, Molecular cloning of a novel vascular endothelial growth factor, VEGF-D. *Genomics* 42, 483-488.
- Yang, W., Klos, K., Yang, Y., Smith, T.L., Shi, D., Yu, D., 2002, ErbB2 overexpression correlates with increased expression of vascular endothelial growth factors A, C, and D in human breast carcinoma. *Cancer* 94, 2855-2861.
- Yazhou, C., Wenlv, S., Weidong, Z., Licun, W., 2004, Clinicopathological significance of stromal myofibroblasts in invasive ductal carcinoma of the breast. *Tumour Biol* 25, 290-295.
- Yogalingam, G., Anson, D.S., 2003, Molecular cloning of feline CD34. *Vet Immunol Immunopathol* 95, 53-61.
- Yonekura, H., Sakurai, S., Liu, X., Migita, H., Wang, H., Yamagishi, S., Nomura, M., Abedin, M.J., Unoki, H., Yamamoto, Y., Yamamoto, H., 1999, Placenta growth factor and vascular endothelial growth factor B and C expression in microvascular endothelial cells and pericytes. Implication in autocrine and paracrine regulation of angiogenesis. *J Biol Chem* 274, 35172-35178.
- Yonemura, Y., Endo, Y., Fujita, H., Fushida, S., Ninomiya, I., Bandou, E., Taniguchi, K., Miwa, K., Ohoyama, S., Sugiyama, K., Sasaki, T., 1999, Role of vascular endothelial growth factor C expression in the development of lymph node metastasis in gastric cancer. *Clin Cancer Res* 5, 1823-1829.
- Young B., Heath, J.W., 2006, *Wheater's Histología funcional, texto y atlas en color*, 4ª edición. Harcourt. 86-151 p. pp.
- Zha, S., Yegnasubramanian, V., Nelson, W.G., Isaacs, W.B., De Marzo, A.M., 2004, Cyclooxygenases in cancer: progress and perspective. *Cancer Lett* 215, 1-20.
- Zhang, H.T., Craft, P., Scott, P.A., Ziche, M., Weich, H.A., Harris, A.L., Bicknell, R., 1995, Enhancement of tumor growth and vascular density by transfection of vascular endothelial cell growth factor into MCF-7 human breast carcinoma cells. *J Natl Cancer Inst* 87, 213-219.

- Zhang, S., Zhang, D., Sun, B., 2007, Vasculogenic mimicry: current status and future prospects. *Cancer Lett* 254, 157-164.
- Zhang, W., Ran, S., Sambade, M., Huang, X., Thorpe, P.E., 2002, A monoclonal antibody that blocks VEGF binding to VEGFR2 (KDR/Flk-1) inhibits vascular expression of Flk-1 and tumor growth in an orthotopic human breast cancer model. *Angiogenesis* 5, 35-44.
- Zhang, X.H., Huang, D.P., Guo, G.L., Chen, G.R., Zhang, H.X., Wan, L., Chen, S.Y., 2008, Coexpression of VEGF-C and COX-2 and its association with lymphangiogenesis in human breast cancer. *BMC Cancer* 8, 4.
- Zuccari, D.A., Santana, A.E., Cury, P.M., Cordeiro, J.A., 2004, Immunocytochemical study of Ki-67 as a prognostic marker in canine mammary neoplasia. *Vet Clin Pathol* 33, 23-28.